

BEATA DĄBROWSKA – BOUTA

**METABOLICZNE I STRUKTURALNE ZMIANY W MIELINIE
MÓZGU SZCZURA W WARUNKACH PRZEWLEKŁEGO DZIAŁANIA
JONÓW OŁOWIU.**



25 253

H 3416

Praca doktorska

Promotor:

Prof. dr hab. Urszula Rafałowska

Pracownia Patoneurochemii, Zakład Neurochemii,

Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej

im. Mirosława Mossakowskiego

Polskiej Akademii Nauk

Warszawa 2005

Promotorowi niniejszej rozprawy,

*Pani Profesor dr hab. Urszuli Rafałowskiej składam serdeczne podziękowania za
wszechstronną opiekę, ogromną pomoc i życzliwość okazaną podczas przygotowywania i
pisania pracy.*

Panu Docentowi dr hab. Michałowi Walskiemu dziękuję za pomoc w trakcie wykonywania badań z zakresu mikroskopii elektronowej.

Pani Doktor Lidii Strużyńskiej składam gorące podziękowania za okazaną pomoc w trakcie przygotowania pracy.

Serdecznie dziękuję Pani Aleksandrze Lenkiewicz za fachową pomoc techniczną i życzliwość w trakcie wykonywania części doświadczalnej pracy.

Badania eksperymentalne opisane w rozprawie doktorskiej zostały przeprowadzone w Pracowni Patoneurochemii w Zakładzie Neurochemii Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk w Warszawie.

Przedstawione w rozprawie wyniki badań zostały opublikowane w następujących publikacjach:

1. Dąbrowska-Bouta B., Strużyńska L., Rafałowska U. (1996) Does lead provoke the peroxidation process in rat brain synaptosomes? *Mol. Chem. Neuropathol.*, 29: 127-139.
2. Dąbrowska-Bouta B., Strużyńska L., Rafałowska U. (1996) Effect of acute and chronic lead exposure on the level of sulfhydryl groups in rat brain. *Acta Neurobiol. Exp.*, 56: 233-236.
3. Dąbrowska-Bouta B., Sulkowski G., Bartosz G., Walski M., Rafałowska U. (1999) Chronic lead intoxication affects the myelin membrane status in the central nervous system of adult rats. *J. Mol. Neurosci.*, 13: 127-139.
4. Dąbrowska-Bouta B., Sulkowski G., Strużyńska L., Rafałowska U. (2004) CNPase activity in myelin from adult rat brains after prolonged lead exposure in vivo. *Chem. Biol. Interact.*, 150: 171-178.

SPIS TREŚCI

1. Wstęp	1
1.1. Wprowadzenie.....	1
1.2. Źródła ekspozycji na ołów.....	1
1.3. Rodzaje narażenia na ołów.....	4
1.4. Pobieranie, wchłanianie i wydalanie ołowiu przez organizm.....	5
1.5. Ołów we krwi.....	6
1.6. Rozmieszczenie ołowiu w organizmie.....	7
1.7. Biochemiczne wskaźniki określające wielkość narażenia na toksyczne działanie ołowiu.....	8
1.8. Wpływ ołowiu na narządy i układy organizmu oraz kliniczne objawy zatrucia ołowiem.....	9
1.9. Leki stosowane w zatruciach ołowiem.....	12
1.10. Toksyczność ołowiu w układzie nerwowym.....	13
1.10.1. Toksyczność ołowiu w obwodowym układzie nerwowym....	13
1.10.2. Toksyczność ołowiu w ośrodkowym układzie nerwowym (o.u.n.)	14
1.11. Mielina.....	18
1.11.1. Powstawanie i budowa mieliny ośrodkowego układu nerwowego.....	18
1.11.2. Lipidy mieliny.....	23
1.11.3. Białka mieliny.....	24
1.11.4. Nieprawidłowości w strukturze mieliny i choroby demielinizacyjne.....	26
2. Założenia i cel pracy	29
3. Materiały i metody	32
3.1. Zwierzęta doświadczalne i model przewlekłego zatrucia ołowiem.....	32
3.2. Oznaczenie poziomu ołowiu w materiale zwierzęcym.....	33
3.3. Izolacja frakcji mielinowej.....	34
3.4. Otrzymywanie frakcji zakończeń nerwowych (frakcji synaptosomalnej).....	34
3.5. Ocena morfologiczna mieliny w mikroskopie elektronowym.....	35

3.6. Badanie płynności błon mieliny.....	35
3.6.1. Technika elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR).....	35
3.6.2. Metoda spektrofлуorymetryczna.....	36
3.7. Badanie komponenty lipidowej mieliny.....	37
3.7.1. Oznaczanie poziomu fosfolipidów.....	37
3.7.2. Oznaczenie fosforu nieorganicznego.....	38
3.7.3. Oznaczanie poziomu cholesterolu.....	38
3.7.4. Oznaczenie peroksydacji lipidów.....	39
3.8. Badanie komponenty białkowej mieliny.....	39
3.8.1. Oznaczanie stężenia białka.....	39
3.8.2. Elektroforeza białek w żelu poliakrylamidowym (SDS-PAGE).....	40
3.8.3. Przenoszenie białek na membrany metodą elektroblotingu.....	40
3.8.4. Immunodetekcja metodą western blot (immunobloting).....	40
3.8.5. Oznaczanie aktywności enzymatycznej CNPazy.....	41
3.8.6. Densytometria.....	41
3.8.7. Oznaczenie ilości grup sulfhydrylowych.....	42
3.8.8. Oznaczenie całkowitej ilości grup SH (T-SH).....	42
3.8.9. Oznaczenie ilości niebiałkowych grup SH (NP-SH).....	42
3.9. Analiza statystyczna.....	42
4. Wyniki.....	43
4.1. Zawartość Pb w organizmie szczura w wyniku przewlekłej ekspozycji.....	43
4.2. Ocena morfologiczna frakcji mielinowej izolowanej z mózgow szczurów kontrolnych i poddanych przewlekłej ekspozycji na ołów.....	46
4.3. Ocena morfologiczna oligodendrocytów w mózgow szczurów kontrolnych i poddanych przewlekłej ekspozycji na ołów.....	48
4.4. Wpływ ołowiu na stan płynności błon mieliny.....	50
4.4.1. Ocena stanu płynności błon mieliny techniką EPR.....	50
4.4.2. Ocena stanu płynności błon mieliny metodą spektrofлуorymetryczną.....	52
4.5. Poszukiwanie biochemicznych, molekularnych mechanizmów odpowiedzialnych za zaburzenia płynności błon mieliny w warunkach przewlekłej ekspozycji na ołów.....	53

4.5.1. Komponenta lipidowa mieliny szczurów a przewlekłe zatrucie ołowiem.....	54
4.5.1.1. Wpływ przewlekłego zatrucia ołowiem na procesy peroksydacyjne w mózgu.....	54
4.5.1.2. Wpływ przewlekłego zatrucia ołowiem na poziom cholesterolu w mielinie o.u.n.....	57
4.5.1.3. Wpływ przewlekłego zatrucia ołowiem na komponentę fosfolipidową mieliny.....	58
4.5.2. Ocena komponenty białkowej mieliny szczurów kontrolnych i zatrutych ołowiem.....	61
4.5.2.1. Wpływ ołowiu na stężenie niebiałkowych i białkowych grup –SH w mielinie zwierząt kontrolnych i przewlekłe zatrutych ołowiem.....	62
4.5.2.2. Wpływ przewlekłej ekspozycji na ołów na całkowite stężenie białka w mielinie.....	63
4.5.2.3. Skład białkowy mieliny ośrodkowego układu nerwowego u zwierząt eksponowanych na ołów.....	64
4.5.2.4. Wpływ ołowiu na aktywność 2'3'cyklicznej nukleotyd-3'fosfodiesterazy (CNP-azy).....	65
4.5.2.5. Wpływ ołowiu na zawartość CNP-azy w mielinie.....	69
5. Dyskusja.....	71
6. Wnioski.....	83
7. Streszczenie.....	84
8. Piśmiennictwo.....	88

STOSOWANE SKRÓTY I SYMBOLE

- ALAD – dehydrogenaza kwasu δ -aminolewulinowego
- ATP – adenzyno-5'-trifosforan
- BBB – bariera krew/mózg
- CNPaza – 2'3'-cykliczna nukleotydowa fosfodiesteraza
- dl -decylitr
- DPH – 1,6-difenylo 1,3,5-hexatrien
- Dz.U. – Dziennik Ustaw
- ECL – wzmacniona chemiluminescencja (ang. enhanced chemiluminescence)
- EDTA – kwas etylenodiaminotetraoctowy (kwas wersenowy)
- EPR – elektronowy rezonans paramagnetyczny
- GABA – kwas γ -aminomasłowy
- K_M – stała Michaelisa
- M5NS – ester metylowy kwasu 5' doksylostearynowego
- MDA – aldehyd malonylowy
- NIK – Najwyższa Izba Kontroli
- o.u.n. – ośrodkowy układ nerwowy
- p – poziom istotności
- Pb – ołów
- PbB – stężenie ołowiu we krwi
- PBS – bufor: 137mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3mM Na₂HPO₄; 1,4mM KH₂PO₄; pH7,3
- PC – fosfatydylocholina
- PE –fosfatydyloetanolamina
- PI – fosfatydyloinozytol
- PMSF – fluorek fenylometanosulfonowy
- PP – protoporfina
- PS – fosfatydyloseryna
- SD – odchylenie standardowe
- SDS – sól sodowa siarczanu dodecyłu
- SH – grupy sulfhydrylowe
- SM – sfingomielina
- SM – stwardnienie rozsiane
- TBA – kwas tiobarbiturowy

TBARS – substancje reagujące z kwasem tiobarbiturowym

TCA – kwas trichlorooctowy

TEMED – N,N,N',N'-tetrametylenodiamina

TPBS – bufor PBS z dodatkiem 0,05% Tween 20

TRIS – 2-amino-2-hydroksymetyloprepan-1,3-diol [tri(hydroksymetylo)aminometan]

V_{MAX} – maksymalna szybkość reakcji

WHO – Światowa Organizacja Zdrowia

1. WSTĘP

1.1. Wprowadzenie

Rozwój cywilizacji, poza ogromnymi, pozytywnymi i niepodważalnymi osiągnięciami w wielu dziedzinach życia, prowadzi również do niebezpiecznej ingerencji człowieka w środowisko naturalne. Ingerencja ta jest groźna dla życia biologicznego m.in. na skutek odprowadzania do środowiska substancji toksycznych. Jedną z bardziej niebezpiecznych toksyn, której stężenie w biosferze ciągle utrzymuje się na wysokim poziomie jest ołów (Pb) – pierwiastek o liczbie atomowej 82 i masie atomowej 207,2; należący do grupy węglowców, miękki, kowalny i łatwo topliwy metal występujący na II i IV stopniu utlenienia (97, 164).

Pomimo, że Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) umieściła ołów na liście najgroźniejszych substancji toksycznych i wprowadziła zarządzenia dotyczące kontroli jego ilości w środowisku oraz ograniczania kontaktu z tym metalem, to nadal jest on jednym z głównych czynników powodujących skażenie środowiska w wielu rejonach Ziemi. Dlatego problem działania ołowiu na organizmy żywe jest wciąż aktualny, a odpowiedź na pytanie „Czy w XXI wieku nadal będzie istniało zagrożenie dla zdrowia wywołane toksycznym działaniem ołowiu?” jest twierdząca (9).

1.2. Źródła ekspozycji na ołów

Ołów w środowisku pochodzi ze źródeł **naturalnych** i z **zanieczyszczeń** spowodowanych działalnością człowieka.

W stanie wolnym metal ten występuje w przyrodzie w niewielkich ilościach. Największym jego naturalnym rezerwuarem na ziemi są skały magmowe i metamorficzne, w których stężenie ołowiu kształtuje się w granicach 10-20 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Jest on składnikiem wielu minerałów, takich jak: galena ołowiowa (PbS), anglezyt (PbSO₄), cerusyt (PbCO₃), krokoit (PbCrO₄), piromorfit Pb₅[Cl(PO₄)₃], wulfenit (PbMoO₄) (2, 164). Ilość Pb pochodząca ze

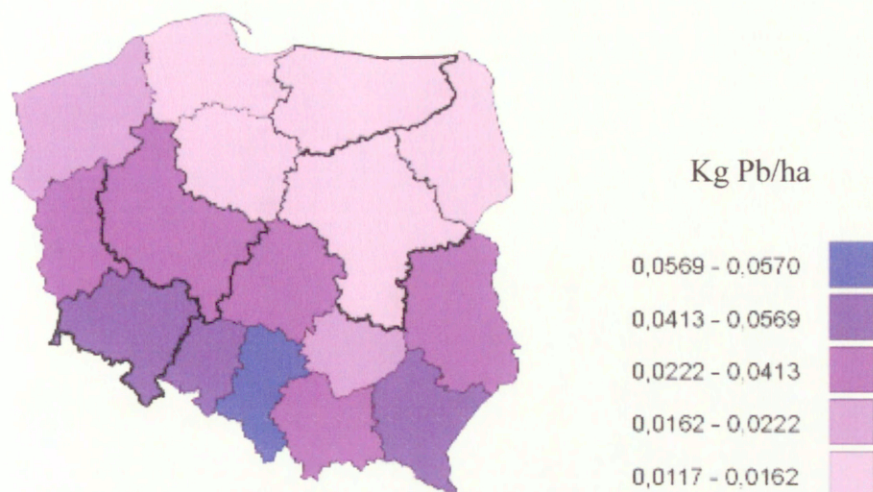
źródeł naturalnych jest z punktu widzenia zagrożenia dla organizmów żywych i zdrowia człowieka w zasadzie nieistotna.

Znacznie większy, wręcz podstawowy udział w ogólnej ilości ołowiu w środowisku ma Pb pochodzący z zanieczyszczeń spowodowanych działalnością człowieka. Łatwe wydobycie i obróbka rud ołowiu były przyczyną bardzo wczesnego wykorzystania tego metalu do różnych wyrobów, które człowiek używał przez całe wieki bez świadomości jego ogromnej toksyczności. Mimo, że przeprowadzane w XX wieku badania uświadomiły społeczeństwu jak dużym zagrożeniem dla środowiska i zdrowia człowieka jest Pb, to jednak wciąż ma on szerokie zastosowanie w różnych dziedzinach przemysłu (2). Procesy wydobycia, wytopu i oczyszczania ołowiu oraz wytwarzania produktów zawierających Pb, związane są z emisją dużych ilości tego pierwiastka, a strefa zanieczyszczeń biosfery wokół w.w. źródeł emisji może sięgać od 5 do 10 km (2, 97). Źródłami największej emisji ołowiu mającymi wpływ na zanieczyszczenie środowiska są: produkcja akumulatorów, stopów, blach ołowiowych, powłok kabli, lakierów i barwników chemicznych, farb, niektórych tworzyw sztucznych, pestycydów, spalanie węgla i paliw, oraz przemysł hutniczy, zbrojeniowy, ceramiczny, szklarski i gumowy.

Ołów gromadzi się w całym otaczającym nas środowisku: **powietrzu, wodzie i glebie.**

W **powietrzu** atmosferycznym stężenie ołowiu jest silnie zróżnicowane, waha się od $0,001 \mu\text{g}/\text{m}^3$ nad biegunem południowym do powyżej $20 \mu\text{g}/\text{m}^3$ nad aglomeracjami miejskimi. Najczęściej wynosi $0,07 - 8 \mu\text{g}/\text{m}^3$, przy naturalnej zawartości $0,0005-0,01 \mu\text{g}/\text{m}^3$ w powietrzu. Globalną antropogenną emisję ołowiu do atmosfery szacuje się na 4×10^5 ton rocznie (2). W Polsce dopuszczalna wartość stężenia ołowiu w powietrzu atmosferycznym na obszarach nie objętych żadną formą ochrony szczególnej wynosi $0,5 \mu\text{g}/\text{m}^3$, a dla obszarów ochrony uzdrowiskowej - $0,05 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (44). W wyniku badań opartych na pomiarach ilości ołowiu wniesionego przez opady atmosferyczne opracowano rozkład tzw. rocznych ładunków

ołowiu wyrażonych w kg Pb/hektar na terenie Polski w 2000 r. (163). Wartości te przedstawia schemat 1.



Schemat 1. Roczne ładunki jednostkowe ołowiu wniesione przez opady atmosferyczne w 2000 roku na obszar poszczególnych województw Polski (163).

<http://www.katowice.pios.gov.pl/raporty/raport/index1.html>

Stężenia ołowiu przekraczają wartości dopuszczalne przede wszystkim w woj. śląskim, opolskim, dolnośląskim i podkarpackim.

Najwięcej tego pierwiastka jest oczywiście w bliskości aglomeracji miejskich, centrów cywilizacji, jednakże obserwuje się również wzrost zanieczyszczenia Pb nad obszarami niezamieszkałymi spowodowane rozprzestrzenianiem się Pb na duże odległości dzięki prądom powietrznym (51, 60).

W **glebach**, ze względu na słabą migrację ołowiu naturalne jego rozmieszczenie w profilu glebowym odzwierciedla zawartość w skałach macierzystych. Naturalną ilość Pb w glebie szacuje się na 13-16 mg/kg gleby (51, 97). Jednakże, poza pulą naturalnego Pb, gleby są miejscem kumulacji większości ołowiu pochodzącego ze spalin samochodowych, spalania odpadów, hutnictwa oraz opadów atmosferycznych. Intensywność kumulacji ołowiu zależy od rodzaju i właściwości gleb, takich jak pH, potencjał redox, skład mineralny, ilość substancji organicznych. Największe zagrożenie dla ekosystemów stanowi zanieczyszczenie

ołowiem lekkich gleb kwaśnych, które charakteryzują się najlepszą rozpuszczalnością kompleksów Pb z różnymi anionami (60, 97, 164). Całkowite stężenie ołowiu w glebach oddalonych od działalności człowieka zbliżone jest do wartości naturalnych zanieczyszczeń i wynosi 5-25 mg/kg (97). Znacznie większe nagromadzenie tego metalu występuje w obrębie dużych miast. Według raportu Wojewódzkiego Inspektoratu Ochrony Środowiska w Katowicach z 2002r. poziomy Pb stwierdzone w glebach na obszarze Polski wahają się w granicach od 0,1 mg/kg do 5000 mg/kg gleby, przy dopuszczalnej przez normy polskie zawartości od 30 mg/kg (gleby lekkie) do 70 mg/kg (gleby ciężkie) (163).

W **wodach** zawartość ołowiu jest niska. Średnie stężenie Pb w jeziorach i rzekach oszacowano na 10 $\mu\text{l/l}$, w wodach morskich od 0,4 $\mu\text{l/l}$ do 0,08 $\mu\text{l/l}$, a w wodach gruntowych od 1 do 60 $\mu\text{l/l}$ (97, 163).

Niska zawartość ołowiu w wodach spowodowana jest wytrącaniem Pb przez różne jony obecne w zbiornikach wodnych i deponowaniem go w postaci osadów i zawiesin, które jednak wpływają degradująco na środowisko wodne. Znacznie więcej Pb niż w naturalnych zbiornikach wodnych może znajdować się w wodzie wodociągowej, np. sieć wodociągowa w Gdańsku zawiera 12 km rur ołowianych (98).

1.3. Rodzaje narażenia na ołów

Ekspozycja na ołów może mieć charakter zawodowy lub środowiskowy. Narażenie zawodowe występuje wśród pracowników zakładów przemysłowych wykorzystujących ołów. Narażenie środowiskowe dotyczy przede wszystkim mieszkańców dużych miast, terenów w pobliżu hut i innych źródeł emisji ołowiu oraz ludzi zamieszkujących tereny położone w pobliżu nasilonego ruchu samochodowego.

Ekspozycja na ołów może mieć charakter **ostry** lub **przewlekły - chroniczny**. Ostre zatrucia spowodowane dużymi dawkami, groźne dla życia, występują na ogół w narażeniach zawodowych lub są wynikiem nieszczęśliwych wypadków.

Obecnie w krajach wysokorozwiniętych, dzięki wzrastającej wiedzy dotyczącej toksyczności ołowiu, lepszej diagnostyce i higienie pracy, ilość **ostrych zatruc** jest niewielka. Tym niemniej, szerokie zastosowanie i ogromna użyteczność ołowiu uniemożliwiająca w dużym stopniu jego ograniczenie, nasuwają pytanie o skutki zdrowotne spowodowane skażeniami środowiskowymi – działaniem niskich dawek w czasie długiego okresu narażenia **(zatrucia przewlekłe)**.

1.4. Pobieranie, wchłanianie i wydalanie ołowiu przez organizm

Ołów może gromadzić się w organizmie już podczas rozwoju prenatalnego (ołów przechodzi przez łożysko) jak i po urodzeniu, w rezultacie ekspozycji na różne jego źródła (8, 50, 77). Do organizmu ludzi i zwierząt pierwiastek ten dostaje się ze środowiska za pośrednictwem powietrza, wody i żywności głównie poprzez układ oddechowy i przewód pokarmowy (59). Stopień jego przyswajania jest uzależniony od wielu czynników, wśród których skład pożywienia oraz aktywność metaboliczna odgrywają znaczącą rolę (4, 51, 54).

Ołów wchłaniany z powietrzem atmosferycznym w postaci cząstek o średnicy poniżej $1\mu\text{m}$ osadza się głównie w głębszych odcinkach układu tchawiczo-oskrzelowego i w pęcherzykach płucnych. Cząsteczki większe są zatrzymywane w górnych drogach oddechowych i usuwane przez odkrztuszanie lub połknięte. Cechy strukturalne i fizjologiczne układu oddechowego, głębokość i częstotliwość oddechu oraz rozpuszczalność wdychanych cząstek w wodzie mają duże znaczenie przy absorpcji ołowiu z powietrza (60, 97). Pobieranie, a następnie wchłanianie ołowiu z przewodu pokarmowego uzależnione jest od rodzaju diety oraz obecności jonów (fosforanowych, siarczkowych, żelaza, miedzi czy wapnia). Dieta bogato tłuszczowa zwiększa wchłanianie, bogato białkowa obniża je (89). Nieorganiczne związki Pb wchłaniają się stosunkowo słabo. Niedobór żelaza, wapnia i miedzi w diecie powoduje nasilenie objawów zatrucia i zwiększoną retencję ołowiu w tkankach (54, 89, 94, 129, 130). Ryzyko wystąpienia efektów patologicznych wywołanych ołowiem zależy

również od wieku. W warunkach standardowej diety u osobników dorosłych, wchłanianie wynosi ok. 10% ołowiu dostającego się do przewodu pokarmowego, u młodych zaś 50%. Różne są także ilości Pb pobierane z żywności, wody i powietrza. Szacunkową ocenę tych wartości przedstawia tabela 1.

Tabela 1.

Szacunkowa ocena średniego dobowego pobierania Pb (58, 152).

Wiek	Średnia zawartość i wielkość wchłaniania Pb/dobę					
	Żywność		Woda		Powietrze	
	Pobieranie ($\mu\text{g Pb}$)	Wchłanianie ($\mu\text{g Pb}$)	Pobieranie ($\mu\text{g Pb}$)	Wchłanianie ($\mu\text{g Pb}$)	Pobieranie ($\mu\text{g Pb/m}^3$)	Wchłanianie ($\mu\text{g Pb}$)
Dorośli	100	10	20	2	0,5	7
Dzieci	50	25	10	5	1,0	15

Ołów zaabsorbowany w przewodzie pokarmowym i w płucach zostaje wydalany z organizmu głównie z kałem i z moczem, choć niewielkie ilości usuwane są przez pocenie, utratę włosów, zębów, złuszczenie naskórka czy ze śliną (60, 97). Dzienny ubytek ołowiu z organizmu przy narażeniu środowiskowym został oszacowany procentowo i wynosi: w moczu 76%, kale 16% w przypadkach pozostałych w.w. możliwości eliminacji - około 8% (109).

1.5. Ołów we krwi

Ołów, który został wchłonięty przez organizm przedostaje się do krwi, która transportuje go do tkanek, gdzie może być deponowany i następnie wydalany. Mechanizm transportu ołowiu do komórek zależy od formy chemicznej, w jakiej występuje on we krwi. Większość całkowitej ilości ołowiu we krwi pełnej związana jest z hemoglobina erytrocytów,

niewielka jego ilość znajduje się w osoczu (1). Uważa się, że właśnie pula obecna w osoczu jest przede wszystkim odpowiedzialna za jego toksyczność. W osoczu ołów może występować w różnych postaciach: jako wolne jony, luźno związane z białkami, lub składowa metaloprotein. Może również występować w postaci kompleksów z ligandami typu aminokwasów i kwasów karboksylowych (1).

Specyficznymi białkami, które wiążą ołów (obok jonów żelaza) w surowicy krwi są transferyny (63). Natomiast niespecyficznym białkiem wiążącym dla tego metalu jest albumina (127, 128). W białkach ołów łączy się z wieloma grupami chemicznymi głównie sulfhydrylowymi (-SH), ale również karboksylowymi (-COOH), aminowymi (-NH₃), fosforanowymi (-PO₄²⁻) (41, 48).

1.6. Rozmieszczenie ołowiu w organizmie

Początkowe rozmieszczenie ołowiu w organizmie podobnie jak i innych substancji dostających się do krwi, zależy od stopnia ukrwienia poszczególnych narządów. Następnie jest on redystrybuowany zgodnie z powinowactwem narządowym i w warunkach ciągłego wchłaniania, osiąga pewien stan równowagi w rozmieszczeniu w organizmie (4).

Gromadzenie ołowiu w ustroju rozpoczyna się już w okresie płodowym (8, 50, 77) i zwiększa się wraz z wiekiem (4). Całkowita zawartość ołowiu w organizmie 60-70-letniego mężczyzny może osiągać ponad 200 mg. Ołów wykazuje silną tendencję do odkładania się w kościach (94-95% całkowitej zawartości ołowiu w ustroju) w ciągu całego życia (10, 97). W kościach ołów jest kumulowany zarówno w postaci związków koloidalnych jak i krystalicznych, ale może przechodzić z powrotem do krwi, zwłaszcza pod wpływem zaburzeń metabolicznych np. w przypadku niektórych chorób infekcyjnych, kwasicy lub osteoporozie, niedoborze wapnia, urazów, złamań czy hipertermii (84). Uwolnienie związków ołowiu ze szkieletu i wzrost jego zawartości we krwi może nastąpić po wielu latach od okresu narażenia. Uwalnianie Pb z kości zachodzi na drodze odwrotnej wymiany jonowej. Czas uwalniania

wynosi od ok. 17 do 25 lat (10, 84). Aktualnie sądzi się, że puła kostna ołowiu, będąca potencjalnym endogennym źródłem ołowiu, stanowi wysokie ryzyko toksyczności dla populacji narażonej środowiskowo na jego działanie.

W odróżnieniu od kości, tkanki miękkie są miejscem tzw. „mobilnej frakcji ołowiu”. W większości tkanek miękkich, jak również we krwi oraz surowicy, nie obserwuje się znaczącego wzrostu ilości ołowiu wraz z wiekiem od momentu przekroczenia 20-tego roku życia (4, 97). Ilość metalu zawarta w tkankach miękkich jest w stałej równowadze z krwią i uważa się, że ta frakcja jest głównie związana z obserwowanymi objawami zatrucia. Wśród tkanek miękkich wątroba i nerka wykazują największe stężenia Pb, co wiąże się najprawdopodobniej z ich funkcją wydalniczą. Znacznie mniejsze ilości występują w mózgu, mięśniach i innych narządach (51).

1.7. Biochemiczne wskaźniki określające wielkość narażenia na toksyczne działanie ołowiu.

Najczęściej używanym indykatorem narażenia na ołów jest **oznaczanie poziomu ołowiu we krwi (PbB)**, które stanowi test z wyboru. Jest on odzwierciedleniem aktualnego stanu dynamicznej równowagi pomiędzy ilością ołowiu dostającego się do ustroju, wchłoniętego do krwi oraz zdeponowanego w tkankach. Stężenie ołowiu we krwi zależy od rodzaju narażenia oraz od wielkości wchłoniętej dawki (81). W przypadku ostrego zatrucia początkowo ilość Pb we krwi rośnie, a następnie szybko spada na skutek wydalania z moczem i odkładania w tkankach. W chronicznym zatruciu u osobników dorosłych ustala się stan równowagi pomiędzy ilością wchłanianą, zdeponowaną w organizmie i wydalaną (97). Większość badaczy uznała stężenie ołowiu we krwi jako dobry biomarker w przypadku narażenia o charakterze zawodowym. Różnice osobnicze we wrażliwości na Pb mogą mieć wpływ na indywidualne ryzyko wystąpienia różnej ciężkości objawów zatrucia przy podobnej intensywności narażenia, co odzwierciedla się różnym poziomem Pb we krwi (28, 43, 85, 94).

W badaniach narażenia zawodowego, jak również epidemiologicznych i profilaktycznych wykorzystywane są, choć w mniejszym stopniu inne testy określające zawartość ołowiu w tkankach. Pomiar Pb w kościach, zębach i włosach stosuje się do oceny długotrwałego zatrucia ołowiem, zarówno środowiskowego jak i przemysłowego (51, 96, 99). Podobnie jak we krwi, ilość Pb w tkankach zależy również od wrażliwości osobniczej (96).

Innym testem, używanym raczej do wykazania ekspozycji o niskiej intensywności, jest oznaczanie aktywności dehydrogenazy kwasu δ -aminolewulinowego (ALAD) w surowicy. Przy niskich stężeniach Pb-B, kiedy nie obserwuje się jeszcze innych efektów działania Pb, pojawia się stosunkowo szybko obniżenie aktywności tego enzymu (15, 24, 96, 149). Do testów rzadziej stosowanych i mniej precyzyjnych należą również: pomiar poziomu ołowiu i stężenia kwasu δ -aminolewulinowego w moczu oraz stężenie protoporfiryny IX (PP) we krwi. Jest to wykorzystywane do szybkiej diagnostyki zatrucia Pb, jako że PP gromadzi się w erytroblastach i posiada zdolność fluorescencji (51, 107).

1.8. Wpływ ołowiu na narządy i układy organizmu oraz kliniczne objawy zatrucia ołowiem.

Ołów działa szkodliwie na każdy układ i narząd ustroju. Intensywność zmian jest uzależniona od wielkości dawki wchłoniętej przez organizm od wieku i stanu zdrowotnego organizmu. Do narządów najbardziej wrażliwych na toksyczne działanie Pb należą: mózg, nerki, szpik kostny i układ krwiotwórczy.

Wyróżnia się 4 postacie zatrucia ołowiem na podstawie towarzyszących objawów (51, 60).

- żołądkowo - jelitowa przy narażeniu ostrym na wysokie dawki Pb. Objawia się bólami mięśni i żołądka, wymiotami i kolką jelitową;

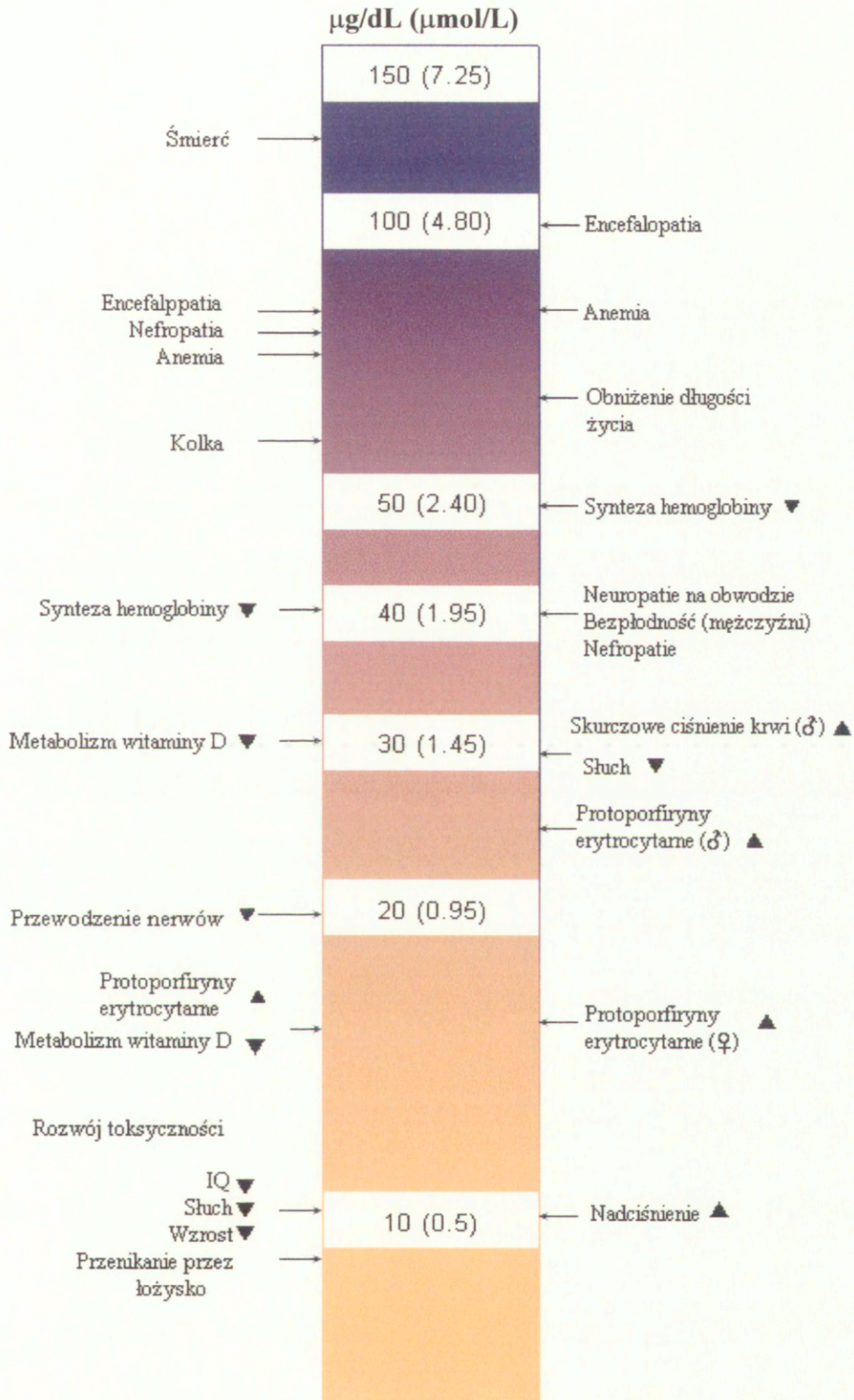
- nerwowo - mięśniowa – objawy ze strony przewodu pokarmowego są łagodne, dominują zaburzenia nerwowo-mięśniowe. W formie ostrej występuje paraliż obejmujący mięśnie przedramienia, dłoni i stóp;
- mózgową (encefalopatia ołowiowa) - obserwowana w warunkach wysokiego narażenia. Zwykle występuje obrzęk mózgu i zmiany naczyniowe, wystąpienie drgawek, śpiączki, aż do zatrzymania krążenia i śmierci;
- postać mieszana - obejmujące wymienione wyżej objawy, ale w różnym natężeniu w zależności od płci i wieku osoby narażonej.

Przy długotrwałym narażeniu często występuje również anemia, na skutek wzmożonej hemolizy. Duże różnice we wrażliwości osobniczej na ołów są ogromnym utrudnieniem w ustaleniu zależności „dawka-efekt”. Wartości dawek (wyrażone poziomem Pb-B) dla poszczególnych efektów są przeważnie określane szacunkowo, a w niektórych przypadkach tylko jako poziomy, przy których nie obserwuje się danego efektu. Dlatego z upływem lat kilkakrotnie zmieniała się przyjęta wartość graniczna stężenia ołowiu uznana za toksyczną.

W pierwszej połowie lat 70-tych za toksyczne uznawano stężenie ołowiu równe i wyższe od 40 $\mu\text{g}/\text{dl}$ krwi (51). W latach 80-tych stężenie to obniżono do 20-30 $\mu\text{g}/\text{dl}$ (97). Wyniki najnowszych badań dotyczących neurotoksyczności ołowiowej wymuszają przesunięcie tej granicy toksyczności nawet do wartości **poniżej 10 $\mu\text{g}/\text{dl}$** (23, 119).

Na schemacie 2 zestawiono szacunkowe zależności pomiędzy stężeniami ołowiu we krwi u dorosłych i dzieci, a klinicznymi efektami jego działania.

Dzieci Stężenie ołowiu we krwi Dorośli



▲ -wzrost funkcji; ▼ - obniżenie funkcji
 ♀ - kobiety, ♂ - mężczyźni

Schemat 2. Zależność dawka-efekt w toksyczności ołowiowej u dzieci i dorosłych (Staudinger K.C., 1998) (134).

Aktualnie dostępne dane literaturowe dotyczące zmian w poszczególnych układach anatomicznych obserwowanych w zatruciu ołowiem są niejednorodne, niepełne, a w przypadku niektórych narządów wręcz marginalne. Rzadko mówią o charakterze zmian biochemicznych i mechanizmów molekularnych odpowiedzialnych za obserwowane efekty zatrucia. Wiadomo jest, że ołów powoduje istotne zmiany uszkadzając w mniejszym lub większym stopniu funkcje wielu układów: oddechowego (51), trawiennego (97), rozrodczego (51, 97), hormonalnego (51, 97), wydalniczego (47, 100) oraz układu krążenia (15, 49, 76, 90, 102). Bardziej dokładne omówienie tych zmian w poszczególnych narządach czy układach wykracza poza tematykę niniejszej rozprawy, dlatego ograniczono się jedynie do podania odpowiednich odnośników literaturowych.

1.9. Leki stosowane w zatruciach ołowiem

Leczenie ołowicy opiera się głównie na stosowaniu wersenianu wapniowo-disodowego CaNa_2EDTA (sól wapniowosodowa kwasu etylenodiaminotetraoctowego), który wiąże jony ołowiu w dobrze rozpuszczalne kompleksy, które są wydalane następnie z organizmu. Do działań ubocznych obserwowanych przy zażywaniu tego leku, należy zwiększone wydalanie z moczem pierwiastków niezbędnych dla organizmu, głównie Cu i Zn (25, 27).

Inny związek chelatujący – 2,3-dimerkaptopropanol (BAL) podawany domięśniowo wywołuje u pacjentów mdłości i wymioty, dlatego podawany jest łącznie z CaNa_2EDTA w przypadkach gdy stężenie ołowiu we krwi przekracza $70\ \mu\text{g/dl}$ (25, 64, 156).

Rzadziej stosowana jest d-penicylamina, podawana doustnie pacjentom, ze średnio wysokimi stężeniami ołowiu we krwi. Związek ten jest mniej efektywny od CaNa_2EDTA i BAL, poza tym wywołuje często reakcje alergiczne dlatego Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków nie zaleca stosowania go u dzieci (156).

W latach 1992-1997 w USA przeprowadzano próby zastosowania kwasu 2,3-dimerkaptobursztynowego (DMSA) w leczeniu ołowiu u dzieci, u których stężenia ołowiu we krwi wynosiły od 20 do 51 $\mu\text{g/dl}$. W czasie podawania DMSA stężenia ołowiu we krwi ulegały obniżeniu średnio od 40 do 70%. Wydalanie ołowiu z moczem było niższe niż w przypadku podawania CaNa_2EDTA , ale nie stwierdzono znaczącego zwiększonego wydalania cynku, miedzi, wapnia i magnezu (116). DMSA mobilizuje Pb z tkanek miękkich – głównie z nerek i mózgu, nie mobilizuje natomiast Pb z wątroby i kości (27, 61, 116).

Leczenie farmakologiczne przynosi lepsze efekty w przypadku pacjentów dorosłych. U dzieci z encefalopatią ołowiową obserwowane są zbyt duże skutki uboczne działania leków chelatujących i często nie osiąga się zadawalającego stanu (60). Powszechnie uważa się, że najbardziej efektywnym działaniem zapobiegającym zatruciom ołowiem jest prewencja eliminująca źródła ekspozycji na Pb w środowisku oraz dieta bogata w wapń, magnez i żelazo (137).

1.10. Toksyczność ołowiu w układzie nerwowym

Przedmiotem naszego szczególnego zainteresowania stał się problem toksyczności ołowiu w układzie nerwowym, a w szczególności w ośrodkowym układzie nerwowym (o.u.n.), który jak wiadomo pełni funkcję integracyjną w organizmie i który wykazuje szczególną wrażliwość na ten metal.

Wpływ ołowiu na układ nerwowy podobnie jak w przypadku innych układów jest uzależniony od czasu narażenia, jego intensywności oraz wieku organizmu. Największą wrażliwość na działanie ołowiu obserwuje się w okresie prenatalnym, kiedy pierwiastek ten, przechodząc przez łożysko do organizmu płodu, może upośledzać jego rozwój (50, 77).

1.10.1. Toksyczność ołowiu w obwodowym układzie nerwowym

W obwodowym układzie nerwowym, w badaniach eksperymentalnych na zwierzętach obserwowano zmniejszenie szybkości przewodnictwa nerwowego, zmiany w mielinie

nerwów obwodowych i zwyrodnienie aksonów (70, 83, 91, 97). U osób przewlekle narażonych na działanie ołowiu wykazano występowanie subklinicznych cech uszkodzenia obwodowego układu nerwowego, w postaci zmian neurogennych w elektromiografii i nieprawidłowej skórnej odpowiedzi potowydzielniczej (12).

1.10.2. Toksyczność ołowiu w ośrodkowym układzie nerwowym (o.u.n.)

Ołów zaabsorbowany w przewodzie pokarmowym i płucach może wnikać do mózgu tylko z krwi. Dlatego naczynia mózgowe są obiektem szczególnego zainteresowania w odniesieniu zarówno do neurotoksycznego działania ołowiu na ściany naczyń jak również do przepuszczalności **bariery krew mózg** (BBB), którą ołów musi pokonać, aby dotrzeć do neuronów i astrogleju.

Początkowo badania nad przepuszczalnością BBB w warunkach zatrucia ołowiem dotyczyły tylko organizmów młodych, dla których Pb jest wysokim zagrożeniem (142). Wykazano, że ostre zatrucie ołowiem powoduje uszkodzenie mikrokrażenia mózgowego, wynaczynienie krwi i obrzęk (76, 104, 105). Większą toksyczność u organizmów młodych wiązano z niedojrzałością bariery krew/mózg. Przez długi czas uważano, że u dorosłych osobników dobrze wykształcona BBB jest wystarczającą ochroną dla mózgu przed wniknięciem Pb. Jednakże rozwój metod autoradiograficznych i mikroskopii elektronowej pozwolił wykazać u dorosłych obecność ołowiu zarówno w naczyniach jak i tkance nerwowej mózgu (57, 145). Bezpośredni wpływ Pb na naczynia dotychczas nie został jednoznacznie określony. Tym niemniej Deane i Bradbury (17, 33) opracowali hipotezę wyjaśniającą transport Pb przez barierę krew/mózg. Według tych badaczy transport Pb przez endotelium mikrokapilar mózgowych u dorosłych szczurów polega na dyfuzji biernej kompleksu jonowego $PbOH^+$ zgodnie z gradientem elektrochemicznym przy jednoczesnym jego ograniczeniu przez transport w kierunku odwrotnym przez Ca-ATPazę (17, 33).

Najbardziej drastyczne objawy kliniczne ze strony ośrodkowego układu nerwowego występują w przypadku ostrego zatrucia ołowiem, które prowadzi do stanów otępienia, niepokoju, drażliwości i bólów głowy, drżenia mięśni, halucynacji oraz zaburzenia pamięci i koncentracji uwagi. Do tych niespecyficznych objawów mogą dołączyć się również drgawki, paraliż i śpiączka (97). W śmiertelnych przypadkach zatruc ołowiem obserwowano uszkodzenia mózgu w postaci obrzęku i zmian w naczyniach krwionośnych mózgu.

Stwierdzono, że przy narażeniu na stosunkowo niskie dawki mogą również występować zmiany czynności mózgu pod postacią obniżonej percepcji, spadku poziomu inteligencji i zdolności uczenia się, jak również zaburzeń słuchu, widzenia, a nawet osobowości (np. agresja) (23, 60, 82, 162). Tego rodzaju dysfunkcje o.u.n. obserwowano szczególnie u dzieci oraz zwierząt laboratoryjnych. Obecnie coraz częściej zwraca się uwagę na ołów jako czynnik wywołujący podobne zaburzenia u dorosłych.

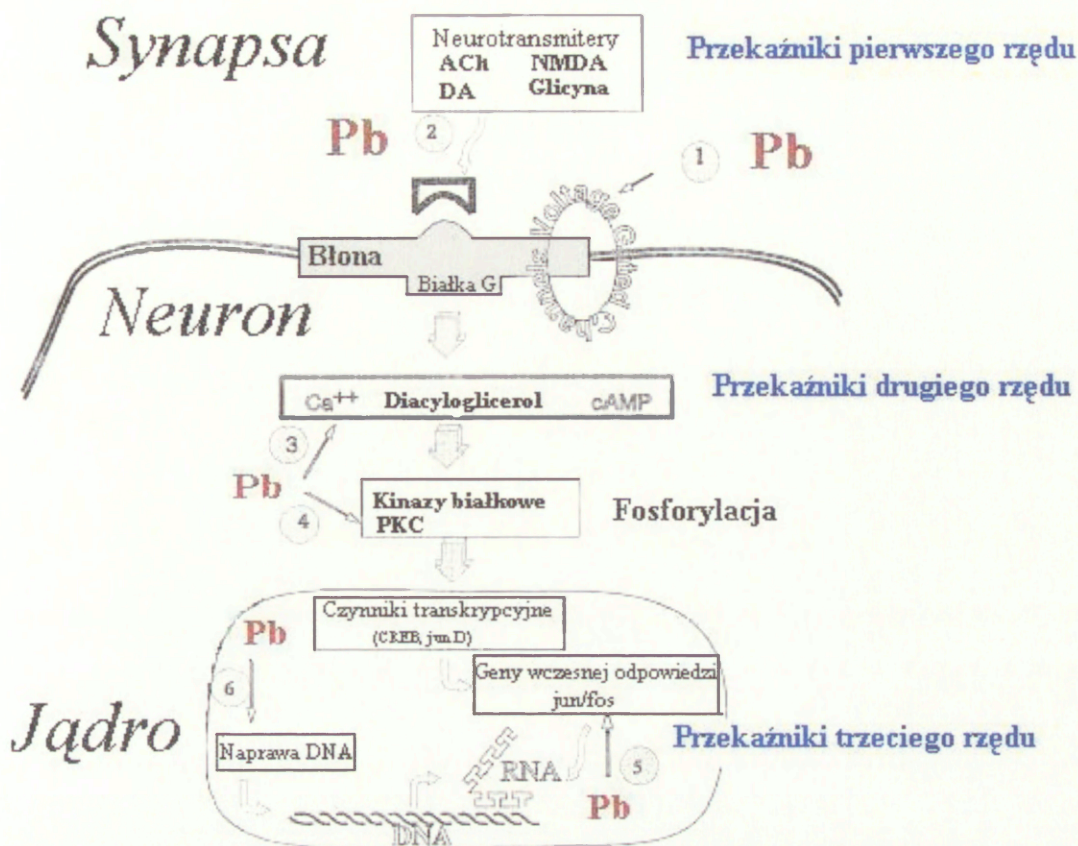
Rozważa się również możliwość występowania skutków długotrwałego wpływu Pb na mózg w postaci zmian biochemicznych przy równoczesnym braku charakterystycznych klinicznych objawów zatrucia ołowiem (122, 125).

Ołów po przedostaniu się do mózgu powoduje **zmiany** w jego **obrazie morfologicznym**, metabolizmie i funkcji.

Większość badań morfologicznych dotyczących toksyczności ołowiowej w ośrodkowym układzie nerwowym prowadzono na modelach zwierzęcych we wczesnym okresie rozwojowym. W stosunku do obrazów otrzymanych ze zwierząt kontrolnych, obserwowano zmniejszenie liczby synaps (124), zmniejszenie grubości kory mózgowej w warstwach komórek piramidalnych ziarnistych (162), obniżenie liczby dendrytów w komórkach warstwy ziarnistej mózdzku u szczurów i świnek morskich (73). U dorosłych szczurów obserwowano zmiany w strukturze synaptosomów i obecnych w nich mitochondriów (111, 123, 124, 138). Wcześniejsze badania lat 70-tych i 80-tych nad

wpływem ołowiu na neuroprzebieżność skupiały się głównie na układzie cholinergicznym i prowadzone były *in vitro* na preparatach nerwowo-mięśniowych (26, 83). Fragmentarycznie badano również inne układy GABA-ergiczny i katecholaminoergiczny (121, 122, 126). Późniejsze prace z lat 90-tych i 2-tysięcznych dogłębniej analizują zmiany w o.u.n. w toksyczności ołowiowej. Dotyczą one chronicznej i ostrej ekspozycji na ołów dorosłych szczurów i dokumentują zmiany w transporcie neuroprzebieżników w zakończeniach nerwowych, co może być prawdopodobną przyczyną zaburzeń neurotransmisji. Zmiany te są różne w zależności od neuroprzebieżnika, co wiąże się z różną wrażliwością poszczególnych typów zakończeń nerwowych w stosunku do ołowiu (139).

Komórkowe, wewnątrzkomórkowe i molekularne mechanizmy neurotoksyczności ołowiu są liczne i nie wszystkie do końca wyjaśnione. Wiadomo, że ołów wpływa na wiele układów biologicznych jak: kanały napięciowo-zależne oraz na przebieżniki pierwszego, drugiego i trzeciego rzędu (schemat 3) (45, 158, 165, 166). Efekty te mogą być związane ze zdolnością ołowiu do interferowania z regulacyjną funkcją wapnia w komórce. Ołów jako dwudodatni jon podobny jest w swojej budowie do jonu wapniowego i może mieć zdolność zastępowania Ca^{2+} w procesach komórkowych, a także mieć wpływ na wewnątrzkomórkową homeostazę Ca (94, 121, 138).



Schemat 3. Możliwe miejsca działania ołowiu na neuron. Wpływ ołowiu na przekaźniki pierwszego, drugiego i trzeciego rzędu wg Finkelstein Y. i wsp. (1998) (45).

Generalnie można przypuszczać, że ołów działa jako chemiczny czynnik stresujący i przyczynia się do zaburzeń wielu mechanizmów komórkowych. W zasadzie nie ma określonego progu, poniżej którego ołów nie wpływa na ośrodkowy układ nerwowy. Graniczne wartości bezpiecznych dla zdrowia stężeń tego metalu we krwi były obniżane w kolejnych latach. Ostatnio udowodniono, że stężenie ołowiu we krwi wynoszące poniżej 10 $\mu\text{g/dL}$ (uważane jeszcze niedawno za bezpieczne) powoduje spadek ilorazu inteligencji u dzieci (23).

Inną, poza zakończeniami nerwowymi, strukturą odgrywającą bardzo ważną rolę w funkcjonowaniu neuronów w ośrodkowym układzie nerwowym jest **mielina**.

Jest ona jednym z głównych czynników zabezpieczających prawidłowość pracy neuronów w o.u.n., a jej destrukcja prowadzi do wielu chorób demielinizacyjnych. Z tego też względu problem toksyczności ołowiu w stosunku do tej struktury w mózgu stał się przedmiotem naszego wyjątkowego zainteresowania i tematem niniejszej pracy, a charakterystyka mieliny o.u.n. została wydzielona i przedstawiona w odrębnym rozdziale (Mielina).

1.11 MIELINA

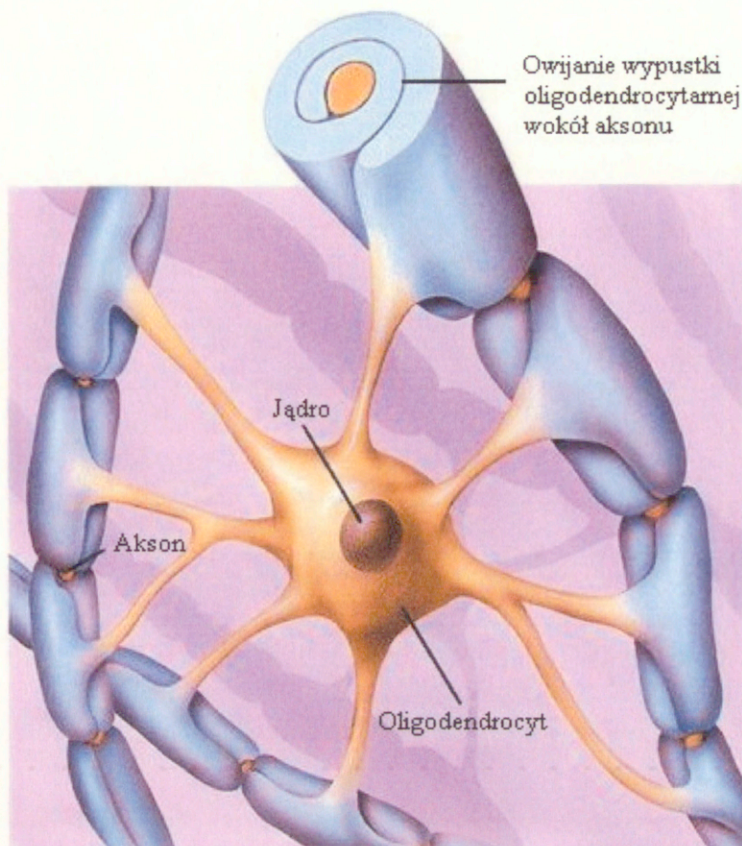
1.11.1 Powstawanie i budowa mieliny ośrodkowego układu nerwowego

Mielina jest wielowarstwową strukturą błonową otaczającą włókna osiowe komórek nerwowych. Mielinę wytwarzają - w obwodowym układzie nerwowym - komórki Schwanna, a w ośrodkowym układzie nerwowym - wyspecjalizowane komórki glejowe – oligodendrocyty. Jeden oligodendrocyt może jednocześnie mielinizować kilkanaście włókien osiowych (93, 113).

Oligodendrocyty powstają w ściśle określonym procesie różnicowania i dojrzewania pierwotnych komórek glejowych tzw. glioblastów (75, 106, 112). Kolejne etapy różnicowania się oligodendrocytów z komórek macierzystych do komórek wysoko wyspecjalizowanych w tworzeniu mieliny, charakteryzują się określonym obrazem morfologicznym i sekwencyjnym pojawianiem się charakterystycznych znaczników glikolipidowych i białkowych. Komórka macierzysta różnicuje się do komórki dwubiegunowej (prooligodendroblastu), następnie do przejściowej postaci komórki wielobiegunowej - prooligodendrocytu, który przekształca się w post mitotyczne, stacjonarne lecz nie w pełni dojrzałe oligodendrocyty, które w końcowym stadium stają się dojrzałymi oligodendrocytami (7).

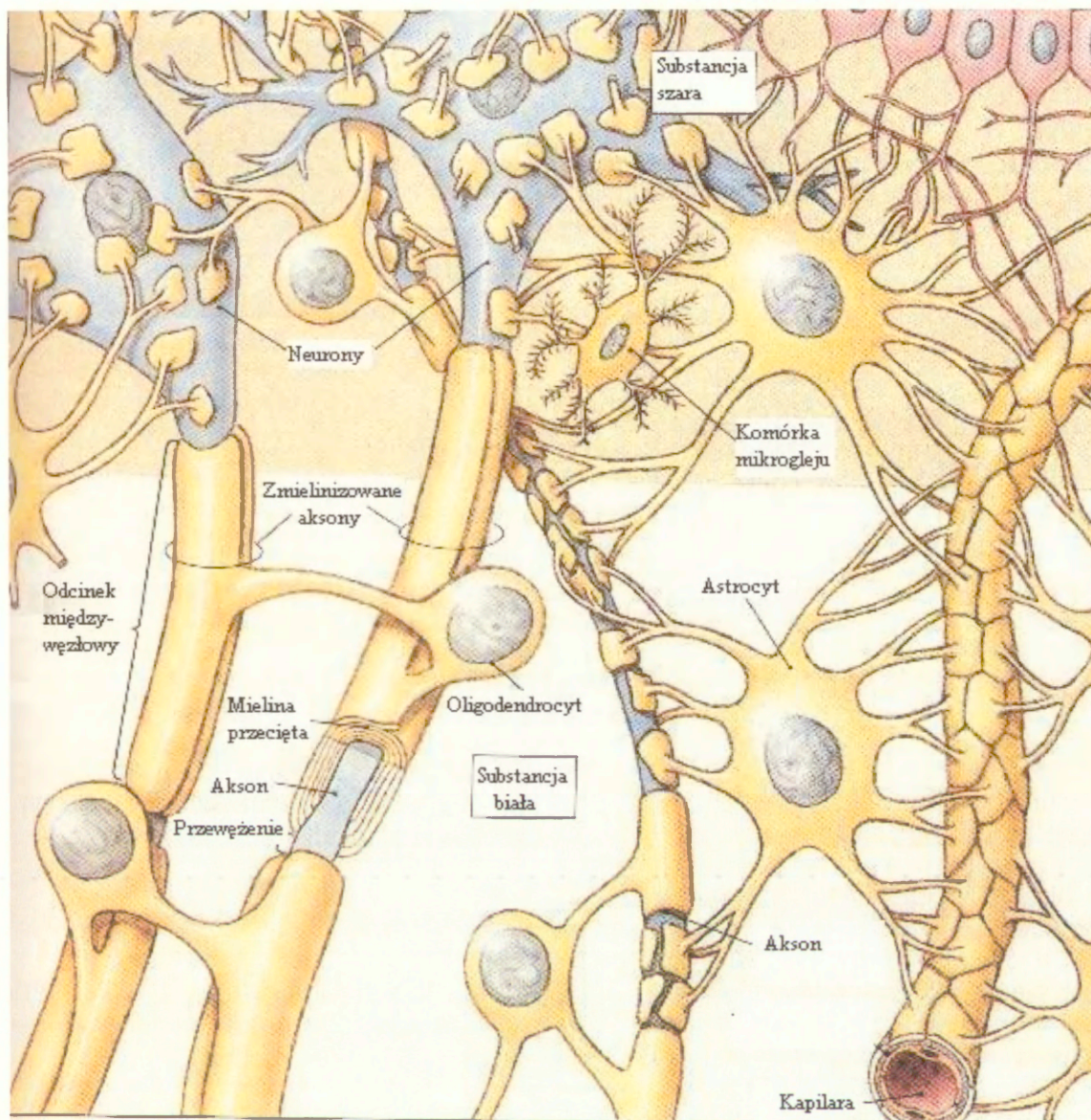
Proces mielinizacji rozpoczyna się w życiu płodowym, natomiast kończy się w różnym czasie po narodzinach, w zależności od gatunku. W trakcie procesu mielinizacji wypustka

oligodendrocytarna obejmuje akson podkowiasto, a następnie owija się wokół niego wielokrotnie tworząc wielowarstwową strukturę, co zobrazowano na schemacie 4.



Schemat 4. Mielinizacja aksonów w ośrodkowym układzie nerwowym wg Jacob L. Driesen, (w: www.driesen.com/myelination_-_cns_%26_pns.htm).

Układ nerwowy zbudowany jest z komórek nerwowych i komórek glejowych, które tworzą sieć połączeń pełniącą funkcje podporowe, ochronne i odżywcze. Dzięki procesowi mielinizacji aksony są odizolowane od siebie i pozostałych substruktur ośrodkowego układu nerwowego, co obrazuje schemat 5.



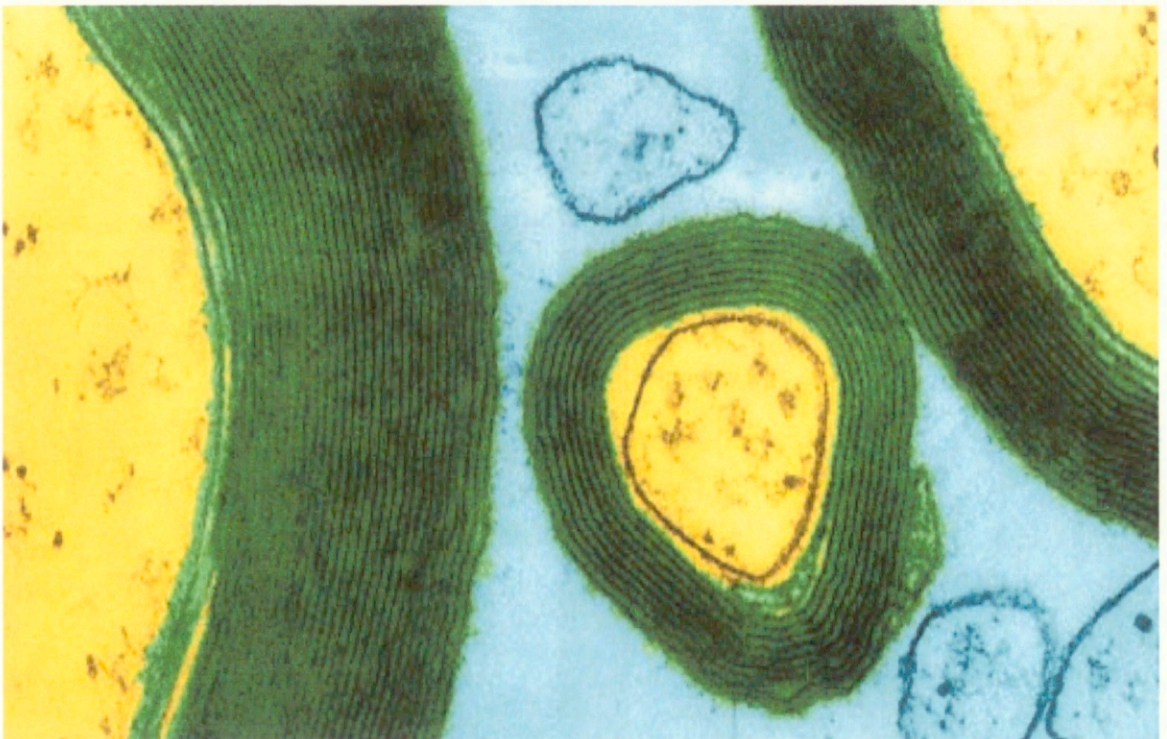
Schemat 5. Tkanka nerwowa w ośrodkowym układzie nerwowym (powiązania między neuronami i neuroglejem).

<http://sun.science.wayne.edu/~bio340/StudentPages/Trpkovska/neurog.html>

Mielinowa izolacja aksonów zabezpiecza prawidłowość przewodzenia sygnałów w mózgu. Osłonka mielinowa podzielona jest tzw. przewężeniami Ranviera na odcinki międzywęzłowe o długości 50-2000 μm , które są proporcjonalne do średnicy i długości aksonu. Przewężenia Ranviera charakteryzują się rozluźnionym układem blaszek, tu bowiem kończą się liczne, wzbogacone w cytoplazmę sfalowania osłonki mielinowej. Węzły Ranviera umożliwiają depolaryzację błony neuronalnej i skokowe przewodzenie impulsu

nerwowego, a szybkość przewodzenia w przypadku włókien nerwowych otoczonych mieliną jest proporcjonalna do średnicy aksonu (93, 95).

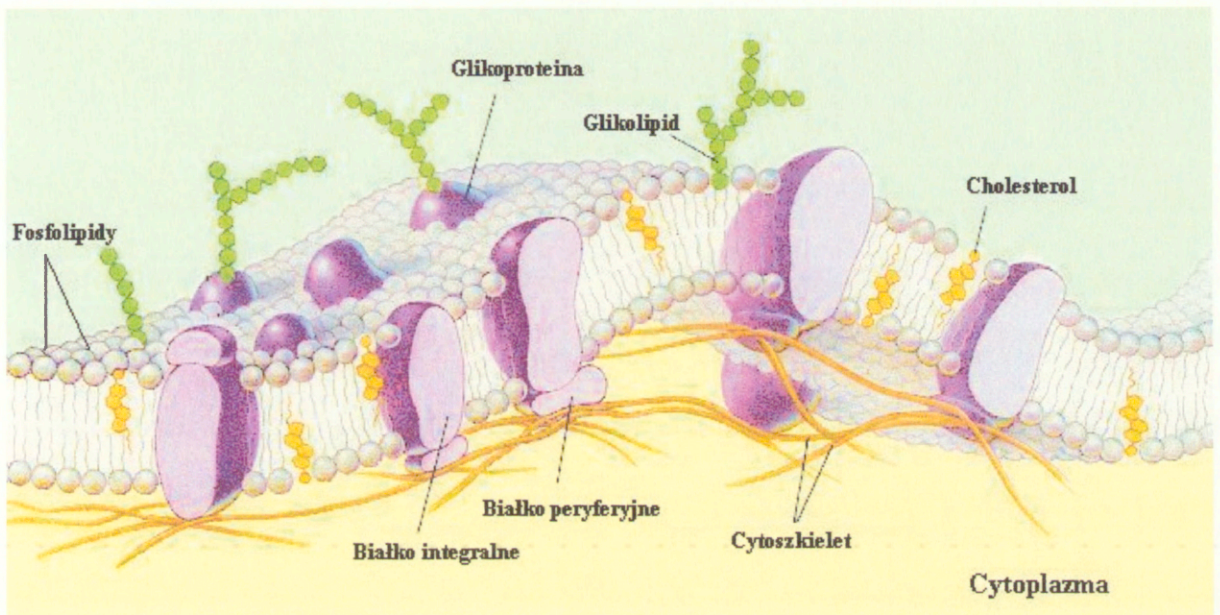
Charakterystyczną cechą prawidłowo ukształtowanej osłonki mielinowej są naprzemiennie koncentrycznie ułożone blaszki jasne i ciemne o średnicach odpowiednio 10 nm i 2,5 nm oddalone od siebie o ok. 8 nm, co dobrze uwidacznia się na zdjęciach mikroskopowo-elektronowych (Ryc. 1) W połowie szerokości blaszek jasnych można dostrzec czasami blaszkę ciemną pośrednią, którą tworzą stykające się ze sobą zewnętrzne powierzchnie błon sąsiadujących ze sobą warstw otoczki mielinowej. Jasną blaszkę tworzą w przeważającej mierze węglowodorowe łańcuchy lipidów, natomiast ciemną blaszkę tworzą przylegające do siebie wewnętrzne warstwy białkowe (7, 93).



Ryc. 1. Przekrój przez osłonkę mielinową otaczającą akson (powiększenie x 190000). (Dennis Kunkel w: www.DennisKunkel.com.)

Błony biologiczne są strukturami typu dwuwarstwowego i są asymetryczne zarówno pod względem strukturalnym, jak i funkcjonalnym. Składają się z peryferyjnych i

integralnych białek oraz z lipidów. Głównymi rodzajami lipidów błonowych są fosfolipidy, glikolipidy i cholesterol. Dwuwarstwa lipidowa zbudowana jest z hydrofobowych grup (w skład których wchodzi łańcuchy kwasów tłuszczowych) i z hydrofilowych grup polarnych. Model biochemicznej budowy błony biologicznej obrazuje schemat 6.



Schemat 6. Model budowy błony biologicznej wg Daniela Chirasa w: *Human Biology*.
(w: www.people.virginia.edu/~rjh9u/cellmemb.html)

Jak widać błona biologiczna jest strukturą mozaikową, bardzo zróżnicowaną zarówno w płaszczyźnie poprzecznej jak i płaszczyźnie dwuwarstwy, na skutek wzajemnych, silnych oddziaływań pomiędzy składnikami błony. Różnice ilościowe poszczególnych składników błon odpowiadają za specyficzność błon. Błony mieliny posiadają charakterystyczny dla niej skład biochemiczny. W przeciwieństwie do innych błon biologicznych odwrócona jest tutaj proporcja ilości białek i lipidów. Lipidy stanowią ok. 70-75% suchej masy, podczas gdy białka ok. 25%-30% suchej masy (7, 93).

1.11.2 Lipidy mieliny

Mielina, jak zaznaczono wcześniej, wyróżnia się od innych struktur błonowych bardzo wysoką zawartością lipidów, ale również składem ilościowym i jakościowym poszczególnych lipidów. Lipidy błonowe obejmują trzy główne klasy: fosfolipidy, glikolipidy i cholesterol (7, 93). Długość łańcucha oraz stopień nasycenia kwasów tłuszczowych poszczególnych lipidów ma istotny wpływ na płynność błon (66).

Wśród lipidów mieliny 25-30% stanowi cholesterol (w innych błonach ok. 17%). Steroid ten występuje tylko w organizmach eukariotycznych. W cząsteczce cholesterolu występuje sztywny pierścień sterydowy, polarna grupa hydroksylowa i grupa apolarna. Amfipatyczne cząsteczki cholesterolu rozmieszczone są pomiędzy łańcuchami alifatycznymi, przez co pełnią rolę regulującą i stabilizującą płynność frakcji lipidowej błon komórkowych.

Okolo 45% lipidów mieliny to fosfolipidy, do których zaliczamy: plazmalogeny, fosfatydyloserynę, fosfatydyloinozytol, fosfatydylocholinę i fosfatydyloetanolaminę. Od 8-10% lipidów mieliny stanowi sfingomielina będąca pochodną aminoalkoholu-sfingozyny. Charakterystyczne rozmieszczenie fosfolipidów w błonach biologicznych zapewnia pełną asymetrię błony komórkowej. Fosfolipidy cholinowe (fosfatydylocholina, sfingomielina) mają mniej nasycone łańcuchy kwasów tłuszczowych, a ich polarne grupy są obojętne. Rozmieszczone są one w zewnętrznej warstwie błony – dośrodkowo. Fosfolipidy aminowe (fosfatydyloseryna, fosfatydyloetanolamina) mają bardziej nasycone łańcuchy alifatyczne, a hydrofilowa grupa fosfatydyloseryny jest ujemnie naładowana. Rozmieszczone są one w wewnętrznej warstwie błony, stykającej się z cytoplazmą (66).

Spośród glikolipidów, które stanowią ok. 30% lipidów mielinowych, najliczniej reprezentowane są specyficzne dla mieliny galaktocerebrozydy. Duża zawartość cerebrozydu w mielinie wskazuje na ewentualne izolujące właściwości tego glikolipidu. Okolo 4% całkowitych lipidów mieliny stanowią sulfatydy, a wśród gangliozydów mielina zawiera duże

ilości monosialogangliozydów GM₁ i unikalny gangliozyd – sialosylgalaktosylceramid GM₄ (93). Glikolipidy są pochodnymi sfingozyny zawierającymi reszty cukrowe, które są zawsze umieszczone na zewnętrznej powierzchni błony komórkowej ssaków, przez co współdziałają w wytwarzaniu i zachowaniu asymetrycznego charakteru błon biologicznych.

1.11.3 Białka mieliny

W składzie białkowej komponenty mieliny występują wysoko specyficzne białka. Główne z nich to: proteolipid PLP (ang. *proteolipid protein*) i jego izoforma DM-20, stanowiące ok. 50% całej puli białek mieliny. Masa cząsteczkowa PLP wynosi ok. 30 kDa. Białko to jest silnie hydrofobowe, występuje tylko w ośrodkowym układzie nerwowym. Masa cząsteczkowa DM-20 kształtuje się na poziomie ok. 20 kDa, jest to białko również silnie hydrofobowe i spotykane jest oprócz o.u.n. w komórkach Schwanna i miocytach serca (7, 93).

Około 30% całej puli białek mielinowych o.u.n. stanowi zasadowe białko mielinowe MBP (ang. *myelin basic proteins*). MBP to grupa niewielkich, silnie zasadowych białek o izoformach mających różne masy cząsteczkowe: 14 kDa; 17 kDa; 18,5 kDa i 21,5 kDa (7, 22). Białka MBP występują po cytoplazmatycznej stronie błony komórkowej i biorą udział w stabilizacji struktury mieliny.

Oprócz wymienionych białek należy wymienić specyficzne dla mieliny glikoproteiny należące do immunoglobulin: MAG (ang. *myelin associated glycoprotein*) i MOG (ang. *myelin/oligodendrocyte glycoprotein*). MAG stanowi mniej niż 1% białek mielinowych. Występuje w dwóch izoformach 67 kDa i 72 kDa (ze względu na wysoki poziom glikozylacji pozorna masa cząsteczkowa wynosi ok. 100 kDa) (7). MAG zlokalizowany jest po wewnętrznej stronie otoczki mielinowej otaczającej akson (6). MOG o masie cząsteczkowej 25 kDa stanowi ok. 0,05% całej puli białek mielinowych. MOG jest wysoce specyficzny dla oligodendrocytów i mieliny. Występuje głównie w zewnętrznej części otoczki mielinowej (20, 132).

Spośród pozostałych białek mielinowych na uwagę zasługuje fosfodiesteraza 2'3'-cyklicznych nukleotydów (CNP), czyli tzw. białko Wolfgrama. CNP występuje w dwóch izoformach o masach cząsteczkowych: 46 kDa i 48 kDa (133). Stanowi ok. 4% białek mieliny. W ośrodkowym układzie nerwowym CNP obecna jest w oligodendrocytach i mielinie, a poza o.u.n. występuje w błonach plazmatycznych komórek o dużej reaktywności, jak komórki siatkówki lub niektóre komórki wchodzące w skład układu odpornościowego. Lokalizacja oraz występowanie w cząsteczce CNP domen charakterystycznych dla białek G wiążących guanozynotrifosforan, przemawiają za aktywnym udziałem tego białka w przenoszeniu sygnałów wewnątrzkomórkowych (18, 19). W oligodendrocytach CNP zlokalizowana jest w sąsiedztwie F-aktyny i mikrotubul, co może sugerować udział w formowaniu cytoszkieletu (132). Jednakże biologiczna rola aktywności enzymatycznej CNPazy jest dotychczas niejasna, ponieważ do chwili obecnej nie wykryto w mózgu 2'3'-nukleotydów – substratów dla CNPazy. Badania genetyczne pozwoliły na ustalenie struktury genów dla CNP u myszy i człowieka. Gen CNP zlokalizowany jest na 11 chromosomie u myszy, natomiast u człowieka na chromosomie 17q21. Stwierdzono również, że CNP posiada dwie z trzech domen charakterystycznych dla GTP, co sugerowałoby brak związku z miejscem katalitycznym tego enzymu (7). W związku z tym odkryciem pojawiła się w ostatnich latach nowa hipoteza dotycząca roli CNP, mianowicie, że funkcja CNP nie musi być związana z aktywnością enzymatyczną i dlatego do chwili obecnej nie znaleziono fizjologicznego substratu (7).

W zachowaniu prawidłowej budowy i metabolizmu komórek, dużą rolę odgrywają grupy sulfhydrylowe (-SH) białek (153, 154). Stabilizują one wewnętrzną strukturę białek i uczestniczą w reakcjach utleniania i redukcji. Obecne są w cząsteczkach endogenego aminokwasu - cysteiny, który występuje niemal we wszystkich białkach. Reszta cysteiny

wchodzi w skład cząsteczki glutationu (najbardziej rozpowszechnionego tiolu, występującego w komórkach ssaków).

1.11.4 Nieprawidłowości w strukturze mieliny i choroby demielinizacyjne

Nieprawidłowa struktura mieliny może być następstwem zaburzeń od początku jej tworzenia, gdzie poprzez różnego rodzaju mutacje, dochodzi do upośledzenia syntezy białek, co skutkuje zaburzeniem struktury i funkcji blaszki mielinowej (7, 92). Dysmielinizacja włókien nerwowych może być również wywołana czynnikami zewnętrznymi, bądź zachodzącymi w różnych procesach chorobowych. W efekcie zmian w strukturze osłonek mielinowych powstają różnorodne zaburzenia neurologiczne takie jak np. niedowłady czy drżenia oraz nieprawidłowości w przekazywaniu informacji.

Istnieje szereg znanych chorób demielinizacyjnych ośrodkowego lub obwodowego układu nerwowego. Jedną z nich jest stwardnienie rozsiane (SM – *sclerosis multiplex*). Jest to choroba zapalno-demielinizacyjna o.u.n., występująca najczęściej w północnych stanach USA, w Kanadzie, Wielkiej Brytanii i w północnej części Europy u ludzi młodych w wieku 20-40 lat. Etiologia SM do chwili obecnej nie jest w pełni poznana. Istnieją dwie hipotezy patogenezы SM: wirusowa i immunologiczna. Obydwie koncepcje wzajemnie się nie wykluczają, ponieważ zakażenie wirusowe mogłoby być pierwszym czynnikiem patogennym, który następnie wyzwałaby reakcję typu autoregresji. Charakterystyczną cechą neuropatologiczną SM jest występowanie rozsianych ognisk – plak demielinizacyjnych, widocznych już makroskopowo na przekrojach mózgu i często zlokalizowanych przy naczyniach (71, 80, 135, 155).

Do innych chorób demielinizacyjnych o.u.n. zalicza się postępujące wielogniskowe zwyrodnienie istoty białej (*leucoencephalopathia multifocalis progressiva*) PML. Uważa się, że demielinizacja w tej jednostce chorobowej występuje na skutek cytolizy oligodendrogleju, spowodowanej namnażaniem się w ich jądrach wirusów (155).

Do chorób demielinizacyjnych zalicza się również: mielinolizę środkową mostu (*myelinolylisis pontis centralis*) (MPC), zapalenie nerwu wzrokowego, chorobę Marburga, chorobę Schildera, stwardnienie koncentryczne BALO czy też chorobę Devica. We wszystkich wymienionych jednostkach chorobowych występuje destrukcja mieliny i demielinizacja (155).

Demielinizacja obserwowana jest również w polineuropatiach i innych zaburzeniach obwodowego układu nerwowego, kiedy obserwuje się rozpad osłonek mielinowych otaczających nerwy obwodowe.

Rozwój cywilizacji sprzyja występowaniu wielu szkodliwych substancji w otaczającym nas środowisku. Kumulacja każdego toksycznego pierwiastka czy związku w narządach organizmu może wpływać negatywnie na jego strukturę, a w konsekwencji na funkcje. Utajone postaci schorzeń często ujawniają się pod wpływem niekorzystnych warunków i przeobrażają w ostrą postać.

Ogniska demielinizacyjne obserwowane są w licznych eksperymentach na zwierzętach, którym podawane są czynniki, mające wywoływać objawy charakterystyczne dla poszczególnych jednostek chorobowych.

W przypadku ołowiu, w badaniach na zwierzętach stwierdzono, występowanie neuropatii obwodowej, ze zmianami demielinizacyjnymi nerwów obwodowych i zwyrodnieniem aksonalnym, a także uszkodzeniem komórek nerwowych rogów przednich rdzenia kręgowego (97). Chroniczna ekspozycja na ołów powoduje uszkodzenie osłonki mielinowej w nerwie kulszowym (70). Obserwowano również zmiany w obrazach mikroskopowych komórek Schwanna u zwierząt eksponowanych na Pb (91). Podając ołów w wodzie do picia lub poprzez dootrzewnowe iniekcje wielu badaczy obserwowało odcinkowe demielinizacje w obwodowym układzie nerwowym (67, 70, 92, 103, 117). W warunkach hodowli komórek Schwanna proces mielinizacji był hamowany przy $1\mu\text{M}$ stężeniu ołowiu

(161). Zdecydowana większość badań nad toksycznością ołowiu w mielinie dotyczyła obwodowego układu nerwowego. Badania nad wpływem ołowiu na mielinę **ośrodkowego układu nerwowego**, miały głównie charakter obserwacji klinicznych i skupiały się raczej na bardzo młodych organizmach, które nie mają w pełni wykształconej bariery krew/mózg (159). Ekspozycję na toksyczne działanie ołowiu prowadzono w okresie prenatalnym lub od chwili narodzin i stosowano bardzo wysokie stężenia związków ołowiu, charakterystyczne dla zatruc ostrych, znacznie przewyższające stężenia Pb w środowisku (146, 148). Obserwowano np. 50% ubytek mieliny w 15 i 30 dniu życia przy zastosowaniu dziennej dawki 400 mgPb/kg masy ciała (147, 148). Obniżenie zawartości mieliny indukowane bardzo wczesną ekspozycją na ołów utrzymywało się do wieku dorosłego (146).

Najnowsze badania Denga W. i Poretza R. D. (35) sugerują, że jedną z przyczyn zmian w mielinie mogą być zaburzenia w poziomie galaktolipidów i aktywności enzymów szlaku galaktolipidów. W badaniach wpływu ołowiu na dojrzewanie oligodendrocytów odpowiedzialnych za tworzenie blaszek mielinowych wykazano, że kultury progenitorów oligodendrocytów są bardziej wrażliwe niż dojrzałe oligodendrocyty (36).

Generalnie ilość prac dotyczących relacji mielina/ołów jest dotychczas niewielka, skupia się głównie na badaniach klinicznych powiązanych głównie z obwodowym układem nerwowym. Dostępne wyniki nielicznych badań nad wpływem ołowiu na mielinę ośrodkowego układu nerwowego z racji różnorodności stosowanych metod i materiałów (in vivo i in vitro) są często przeciwstawne i trudne do jednoznacznej interpretacji.

Do momentu podjęcia badań omawianych w niniejszej pracy brak było danych dotyczących przewlekłego działania niskich dawek ołowiu na mielinę ośrodkowego układu nerwowego u organizmów z wykształconą barierą krew/mózg.

2. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY

W opinii publicznej, aktualnie, narasta przekonanie, że w wyniku działania różnych restrykcyjnych norm wprowadzanych przez Światową Organizację Zdrowia (WHO) i lokalnych zaleceń, ilość ołowiu w środowisku jest coraz mniejsza i tym samym nie może stanowić poważnego problemu zdrowotnego. Niestety, jest to przekonanie błędne, a wrażenie bezpieczeństwa pozorne. Jest wiele obszarów Ziemi, gdzie ilość ołowiu utrzymuje się na bardzo wysokim lub wysokim poziomie, a dodatkowo coraz częściej zwraca się uwagę na toksyczność niskich dawek Pb (do niedawna uważanych za bezpieczne) działających w czasie długotrwałego narażenia i to zarówno u organizmów młodych jak i dojrzałych.

Ośrodkowy układ nerwowy, pełniący integralną funkcję w organizmie, jest szczególnie wrażliwy na działanie ołowiu, a wywołana obecnością jego jonów toksyczność w mózgu jest ciągle przedmiotem zainteresowania wielu ośrodków badawczych.

Dotychczasowe badania neurotransmisji zarówno w warunkach przewlekłej jak i ostrej ekspozycji na ołów (opisane szerzej we wstępie pracy) wykazały poważne zaburzenia w transporcie neuroprzekaźników oraz istotne zmiany w budowie i stanie energetycznym zakończeń nerwowych. W funkcjonowaniu neuronów, poza zakończeniami nerwowymi, niezwykle istotną rolę odgrywa mielinowa osłonka włókien nerwowych. Zmiany w jej strukturze mogą przyczynić się do wystąpienia różnorodnych zaburzeń neurologicznych.

We wcześniejszych badaniach dotyczących toksycznego wpływu jonów ołowiu na osłonkę mielinową w o.u.n. stosowano modele wczesnej ekspozycji (okres prenatalny lub wczesno-postnatalny) oraz bardzo wysokie dawki Pb. Obserwowane zaburzenia w strukturze i funkcji osłonki mielinowej u tak młodych organizmów kojarzono z przepuszczalnością bariery krew/mózg dla jonów Pb wynikającą z niedojrzałości tej bariery.

Do momentu rozpoczęcia niniejszej pracy nie było w literaturze informacji dotyczących skutków przewlekłego narażenia na niskie dawki ołowiu osobników dojrzałych w zaburzeniach budowy i metabolizmu **mieliny mózgu**.

Wydaje się zatem, że podjęcie kompleksowych badań dotyczących przewlekłego działania niskich dawek Pb (imitujących warunki zatrucia środowiskowego) na osłonkę mielinową o.u.n. u szczura z dobrze wykształconą barierą krew/mózg było w pełni uzasadnione.

Badania miały na celu:

1. Określenie poziomu ołowiu we krwi, w homogenacie mózgu, subfrakcji synaptosomalnej i mielinowej o.u.n. oraz porównawczo w wątrobie i kościach po trzymiesięcznej ekspozycji na niskie dawki Pb szczurów z wykształconą barierą krew/mózg.
2. Sprawdzenie czy przewlekłe zatrucie ołowiem zmienia obraz morfologiczny otoczek mielinowych i oligodendrocytów (komórek odpowiedzialnych za tworzenie mieliny o.u.n.) oraz wykazanie ewentualnego związku pomiędzy zaburzeniami morfologicznymi a zmianami w płynności błon mieliny.

Informacje uzyskane z badań wyjaśniających problemy przedstawione w punktach 1-2, stały się punktem wyjścia do dalszych doświadczeń mających na celu poszukiwanie mechanizmów (działających na poziomie struktur subkomórkowych o.u.n.), odpowiedzialnych za zaburzenia płynności i budowy morfologicznej otoczek mielinowych mózgu w przewlekłym zatruciu ołowiem.

Dlatego kolejnym etapem pracy było:

3. Zbadanie komponenty białkowej mieliny w warunkach kontrolnych i zatrucia ołowiem poprzez:

- określenie całkowitej zawartości białek i różnic w specyficznych białkach mieliny,
 - ocenę aktywności, kinetyki oraz zawartości 2'3' cyklicznej nukleotydowej 3' fosfodiesterazy (CNP-azy)
 - oznaczenie poziomu białkowych grup –SH.
4. Zbadanie komponenty lipidowej mieliny w warunkach kontrolnych i zatrucia ołowiem poprzez ocenę wolnorodnikowego utleniania lipidów oraz określenie różnic w zawartości poszczególnych fosfolipidów i cholesterolu.

3. MATERIAŁ I METODY

3.1. Zwierzęta doświadczalne i model przewlekłego zatrucia ołowiem

Doświadczenia na zwierzętach były przeprowadzone zgodnie z zaleceniami Międzynarodowej Komisji Etycznej i za zgodą Lokalnej Komisji Etycznej w Warszawie.

Wszystkie badania prowadzono na szczurach, samcach szczepu Wistar. Eksperyment chronicznego narażenia na ołów rozpoczynano na szczurach trzytygodniowych, natomiast do wykonywania badań używano zwierząt czteromiesięcznych o masie ciała 300-350 gramów. Szczury kontrolne były w tym samym wieku i o ciężarze mieszczącym się w podobnym zakresie. Trzytygodniowe szczury, a więc takie, które mają już w pełni ukształtowaną barierę krew/mózg dzielono na dwie grupy. Zwierzętom z grupy badanej, eksponowanym na ołów, podawano do picia wodę z octanem ołowiowym [$\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$] w stężeniu 200mg/l, natomiast zwierzęta z grupy kontrolnej otrzymywały wodę bez octanu ołowiawego. Ze względu na wytrącanie się chlorków w wodzie wodociągowej, koniecznością było użycie wody dejonizowanej, co jest zgodne z opisami modeli przewlekłego zatrucia ołowiem w literaturze (52, 62, 129). Wszystkie zwierzęta otrzymywały standardowy pokarm laboratoryjny, bogaty w mikroelementy, nie zawierający wykrywalnych ilości ołowiu i nie odbiegający w znaczący sposób składem od norm zalecanych przez amerykański Komitet Żywienia Zwierząt przy National Academy of Science – National Research Council (NAS-NRC) (89).

Tabela 2.

Porównanie składu pokarmu podawanego szczurom w trakcie doświadczenia z zalecanym przez NAS-NRC.

<i>Składnik pożywienia</i>	<i>Norma wg NAS-NRC</i>	<i>Pokarm laboratoryjny</i>
Białko	20	20-24
Tłuszcze	5	3-5
Włókno	Brak zalecenia	5
Ca %	0,5	1
P%	0,4	0,5
Na%	0,05	0,05
Cl- %	0,05	0,05
K%	0,18	0,5
Mg%	0,04	0,5
S ²⁻ %	brak zalecenia	-
Cu (ppm)	5	5
J (ppm)	0,15	0,2
Fe (ppm)	35	50
Mn (ppm)	50	50
Zn (ppm)	12	12
Se (ppm)	0,04	0,04
F (ppm)	brak zalecenia	0,2
Witamina A (IU)	1000	500-1500

Dobową ilość ołowiu pobranego przez zwierzęta eksponowane oceniano mierząc objętość wypitej wody i obliczając średnią ilość zawartego w niej ołowiu przypadającą na jedno zwierzę. Średnia ilość spożytego dziennie ołowiu wynosiła 1 mg.

Po zakończeniu trzymiesięcznej ekspozycji na ołów zwierzęta szybko dekapitowano i pobierano mózg oraz w niektórych przypadkach wątrobę, fragmenty kości i krew. Całą procedurę skracano do niezbędnego minimum (2-3 min.). Następnie materiał bądź przechowywano w temp. -70°C, bądź poddawano dalszym procedurom, w zależności od typu doświadczeń, co zostało zaznaczone w opisie kolejnych metod.

3.2. Oznaczenie poziomu ołowiu w materiale zwierzęcym

Od losowo wybranych zwierząt z grupy eksponowanej na ołów i grupy kontrolnej pobierano mózg, krew, oraz porównawczo wątrobę i kości. Następnie pobrany materiał

spalano w naczyniach teflonowych niskociśnieniowych (do 8 atm), przy użyciu 65% kwasu azotowego o superwysokiej czystości, stosowanego w spektroskopii absorpcji atomowej. Po spaleniu próbki przenoszono ilościowo do kolbek o objętości 25 ml i dopełniano wodą dejonizowaną. Oznaczenia poziomu łożowiu w próbkach wykonywano w spektrofotometrze absorpcji atomowej Perkin Elmer 1100B wobec wzorcowego roztworu łożowiu.

3.3. Izolacja frakcji mielinowej

Z mózgow szczurów kontrolnych i traktowanych łożowiem wydzielono półkule mózgu, które poddawano łagodnej homogenizacji w szklanym homogenizatorze Pottera w 0,32 M sacharozie (1 g materiału na 18 ml). Następnie izolowano frakcję mielinową według metody Nortona i Poduslo (101). Wszystkie czynności przeprowadzane były w 4°C (taką samą temperaturę miały stosowane odczynniki). Homogenat (18 ml) nakładano na 15 ml 0,85 M sacharozy i wirowano przez 30 min. przy 75000 x g (ultrawirówka typu L8-60M, głowica uchylna SW 2820, Beckman). Do zebranej interfazy dodawano 30 ml H₂O destylowanej, aby spowodować szok osmotyczny i ponownie wirowano przy 75000 x g przez 30 min. Osad dwukrotnie zawieszano w 30 ml H₂O destylowanej i odwirowywano przez 15 min. przy 13000 x g. Następnie osad homogenizowano w 15 ml 0,32 M sacharozie, delikatnie nakładano na 15 ml 0,85 M sacharozy i powtarzano wirowanie jak na początku. Otrzymaną frakcję mielinową zawieszano w 2-5 ml H₂O destylowanej z inhibitorami proteaz i rozpipetowywano do próbek po ok. 0,5 ml, które przechowywano w -20 °C.

3.4. Otrzymywanie frakcji zakończeń nerwowych (frakcji synaptosomalnej)

Mózgi szczurów homogenizowano ręcznie przy użyciu szklanego homogenizatora (typ Pottera) w roztworze 0,32M sacharozy z 1mM EDTA i 10mM TRIS-HCl, pH 7,4. 10% homogenat wirowano zgodnie z flotacyjną metodą Bootha i Clarka (14) przez 10 min. przy 17000 x g. Uzyskaną frakcję oczyszczano poprzez odwirowanie w gradiencie stężeń Ficollu przez 30 min. przy 99000 x g. Frakcję synaptosomalną zlokalizowaną

między 12% a 7% roztworem Ficollu, zbierano i przemywano roztworem Krebsa-Ringera o składzie: 140mM NaCl; 5mM KCl; 1,3 MgSO₄ i 10mM TRIS-HCl, pH 7,4, następnie zawieszano w tym samym buforze i używano do dalszych oznaczeń.

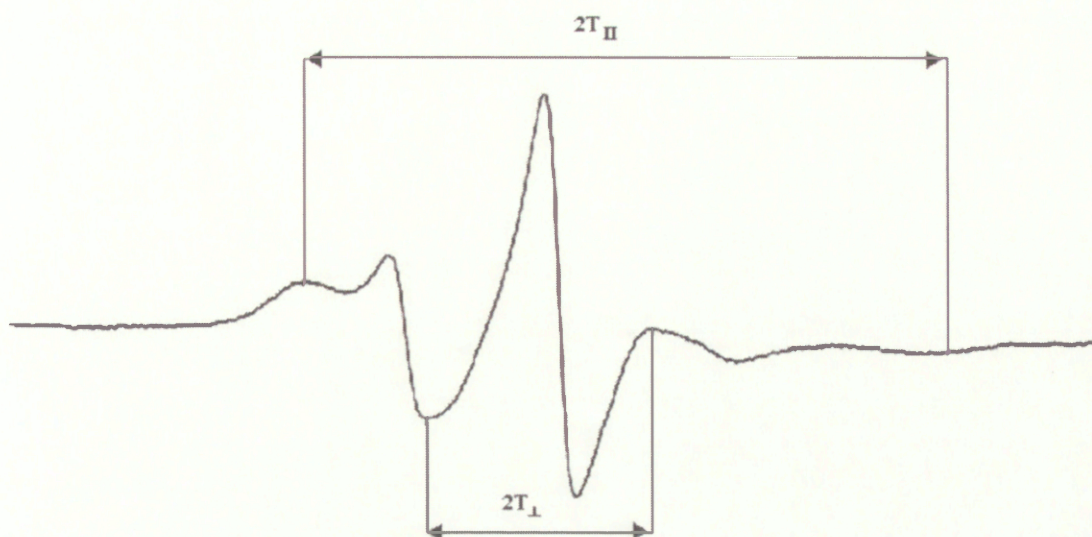
3.5. Ocena morfologiczna mieliny w mikroskopie elektronowym

Zwierzęta, po zastosowaniu narkozy eterowej, poddawano perfuzji przezsercowej roztworem utrwalacza (2% paraformaldehyd i 2,5% glutaraldehyd w 0,1 M buforze kakodylanowym o pH 7,4). Następnie preparowano mózgi i pobierano próbki z obszarów pogranicza istoty szarej i białej, które utrwalano ponownie w roztworze utrwalacza o podanym wyżej składzie, przez 2 godziny. Po przepłukaniu w buforze kakodylanowym, materiał inkubowano w 1,5% roztworze czterotlenku osmu (OsO₄) i 0,8% K₄[Fe(CN)₆] przez 2 godz. Po odwodnieniu w alkoholu etylowym oraz w tlenku propylenu, próbki zatapiano w żywicy Spurr, cięto na ultracienkie skrawki, które oceniano pod mikroskopem elektronowym JEM 1200 EX.

3.6. Badanie płynności błon mieliny

3.6.1. Technika elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR)

Do opisu stanu fizycznego płynnej błony stosuje się pojęcie płynności, będące odwrotnością pojęcia lepkości. Zjawisko to w znacznej mierze dotyczy ruchliwości łańcuchów węglowodorowych wokół osi prostopadłej do płaszczyzny błony. Parametr uporządkowania (S) mierzący sprężystość znacznika, jest czułym opisem zmian płynności błon (21, 53, 56, 65). Kiedy swoista sonda usytuowana jest równolegle do długiej osi drgającej cząsteczki parametr S przyjmuje wartości od 0 (układ nieuporządkowany) do 1 (układ uporządkowany). Do badań płynności błon mieliny użyto lipidowego znacznika spinowego - estru metylowego kwasu 5' doksylostearynowego (M5NS). Z widm EPR (Ryc. 2) liczono parametr uporządkowania lipidów błonowych (S) stosując równanie Gaffney i Mc Namee.



Ryc. 2. Typowe widmo EPR dla znacznika M5NS; T_{II} i T_{\perp} - odpowiednio zewnętrzne i wewnętrzne sprzężenie nadsubtelne.

$$S = [T_{II} - (T_{\perp} + C) / T_{II} - 2(T_{\perp} + C)] \times 1,723$$

$$C = 1,4 - 0,53 (T_{II} - T_{\perp}) \text{ Gauss}$$

Do próbek odpipetowywano 300 μl zawiesiny wyizolowanej mieliny (stężenie białka 3mg/ml) odwirowywano i do osadu dodawano 0,2 μl 25mM M5NS. Następnie próby inkubowano w temperaturze pokojowej przez 1 godzinę. Po inkubacji próbki zatapiano w kapilarach i przeprowadzono pomiary widma EPR w spektrometrze Bruker EPS-3005. Warunki pomiaru: zakres pola – 100 G, amplituda modulacji – 1,01 G, stała czasowa – 5,12 msec., czas pomiaru – 8 min., moc źródła fal – 40 mW, częstotliwość – 9,25 GHz.

3.6.2. Metoda spektrofluorymetryczna

Płynność dwuwarstwy lipidowej mieliny określano w Spektrofluometrze Perkin – Elmer LS-5B przez wyznaczenie współczynnika anizotropii fluorescencji (a) znacznika fluorescyjnego: 1,6 – difenilo 1,3,5 –hexatrien (DPH). Hydrofobowy DPH rozprowadza się w regionach niepolarnych dwuwarstwy lipidowej. Anizotropię fluorescencji wyznaczano korzystając z klasycznego wzoru z uwzględnieniem poprawki aparaturowej G (5, 78, 120).

$$a = (I_{vv} - I_{vh} \cdot G) / (I_{vv} + 2 I_{vh} \cdot G); \quad G = (I_{hv} / I_{hh})$$

gdzie:

a – stanowi anizotropię fluorescencji

I_{vh} i I_{hv} – natężenie fluorescencji światła emitowanego o polaryzacji prostopadłej do kierunku polaryzacji światła wzbudzającego

I_{vv} i I_{hh} – natężenia fluorescencji światła emitowanego o polaryzacji równoległej do kierunku polaryzacji światła wzbudzającego

G – poprawkę aparaturową

Oznaczenia anizotropii fluorescencji były prowadzone zgodnie z następującą procedurą: przemyte trzykrotnie solą fizjologiczną próby mieliny (stężenie białka – 200 μg białka) znakowano dodając roztworu DPH (stężenie końcowe 1 μM). Po trzydziestominutowej inkubacji w ciemności, w temperaturze pokojowej, mierzono natężenie fluorescencji DPH w próbach dla czterech wzajemnych położeń polaryzatora i analizatora ($0^\circ, 0^\circ - I_{vv}$; $0^\circ, 90^\circ - I_{vh}$; $90^\circ, 90^\circ - I_{hh}$; $90^\circ, 0^\circ - I_{hv}$), stosując promieniowanie wzbudzające o długości fali 356 nm oraz mierząc natężenie promieniowania o długości fali 428 nm (5, 120).

3.7. Badanie komponenty lipidowej mieliny

3.7.1. Oznaczanie poziomu fosfolipidów

Lipidy błon mielinowych ekstrahowano mieszaniną chloroform : metanol w stosunku 2:1 (13). Fosfolipidy rozdzielano metodą chromatografii cienkowarstwowej. Fazy chloroformowe z ekstraktu lipidowego nanoszono na płytkę z żelu krzemionkowego (0,2 mm) (Merck, Darmstedt) i rozdzielano w następującym układzie rozpuszczalników: chloroform/metanol/kwas octowy w stosunku 65:35:5 (v/v). Poszczególne składowe po rozdziale wybarwiano jodem i ninhydriną (reaguje z aminofosfolipidami). Plamy reprezentujące poszczególne klasy fosfolipidów usuwano z płytek i oznaczano ilościowo metodą pośrednią poprzez oznaczenie fosforu nieorganicznego.

3.7.2. Oznaczenie fosforu nieorganicznego

Fosfor nieorganiczny oznaczano kolorymetrycznie według metody Rouser i wsp. (1966) (115), która polega na wytworzeniu w środowisku kwaśnym fosfomolibdenianu amonowego z ortofosforanu i molibdenianu amonowego, który pod wpływem czynników redukujących ulega redukcji do błękitu molibdenowego (mieszanina tlenków molibdenu), którego ilość określa się kolorymetrycznie. Próby fosfolipidów (usuwane plamy rozpuszczone w 1ml mieszaniny metanolu i chloroformu) spalano w 70% kwasie nadchlorowym (HClO_4) (w 180°C przez 3 godz.) – końcowe produkty mineralizacji to: CO_2 , H_2O i PO_4^{3-} . Po mineralizacji do prób dodawano 0,5 ml 2,5% molibdenianu amonowego $[(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_2]$ i 0,5 ml 10% kwasu askorbinowego. Powstający barwny kompleks utrwalano poprzez ogrzewanie we wrzącej łaźni wodnej przez 5 min. Po ochłodzeniu prób w ciągu 15 min. mierzono absorpcję przy $\lambda = 660 \text{ nm}$. Ilość fosforu obliczano z krzywej wzorcowej wykonanej dla zakresu stężeń 10-200 nmoli.

Oznaczoną ilość fosforu przeliczano na ilość fosfolipidów, przyjmując, że średnia masa cząsteczkowa fosfolipidu wynosi 800 g/mol a stosunek fosforu w cząsteczce fosfolipidu 1:1.

3.7.3. Oznaczanie poziomu cholesterolu

Do oznaczenia całkowitego cholesterolu zastosowano kolorymetryczną metodę wg Bowmana i Wolfa (16), opartą na barwnej reakcji Zaka (z roztworem żelaza $-\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ w kwasie octowym lodowatym). W pomiarze wykorzystano właściwość cholesterolu do tworzenia nierozpuszczalnego osadu z digitoniną. Próby ekstrahowano mieszaniną acetonu z etanolem. Do supernatantu dodawano digitoninę i po godzinie odwirowywano. Osad wolnego cholesterolu rozpuszczano w odczynniku żelazawym (wyżej wymienionym) i stężonym roztworze H_2SO_4 . Po 30 min. przeprowadzono pomiar absorbancji przy długości fali 550 nm wobec próby kontrolnej, która składała się z odczynnika żelazawego i stężonego roztworu

H₂SO₄. Zawartość cholesterolu wolnego odczytywano z krzywej kalibracyjnej dla roztworu wzorcowego.

3.7.4. Oznaczanie peroksydacji lipidów

Peroksydację lipidów mierzono poprzez określenie poziomu aldehydu malonylowego (MDA) wg metody Wilbur K.M. i wsp. (160) zmodyfikowanej przez Asakawa T. i Matsushita S. (1980) (3). Produkty peroksydacji wielonienasyconych kwasów tłuszczowych mają zdolność tworzenia barwnych kompleksów z kwasem tiobarbiturowym (TBAR - ang.TBA-reactive material). Głównym produktem reakcji z TBA jest dwualdehyd malonylowy (MDA), dlatego w dalszej części pracy będzie używane uproszczone określenie „MDA” zamiast opisowej formy „związki reagujące z TBA”.

Frację mielinową oraz homogenaty mózgowy i wątrobowy zawieszano w buforze Krebsa-Ringera o pH 4 do stężenia białka ok. 0,2 mg/ml i homogenizowano. Następnie dodawano 25 μM FeCl₃, 800 μM ADP i 200 μM askorbinianu sodu i inkubowano przez 15 min. w łaźni wodnej w temp. 30°C, zgodnie z Rafałowska i wsp. (1989) – peroksydacja żelazozależna (110). Równolegle inkubowano próby bez dodatku w.w. substancji – peroksydacja spontaniczna. Następnie do prób dodawano 1ml 30% TCA, 0,1 ml 5M HCl, 1 ml 0,75% TBA i inkubowano 20 min. w temperaturze 100°C pod chłodniczką zwrotną. Po odwirowaniu (4000 obrotów/min. przez 10min.), przeprowadzano pomiar spektrofotometryczny przy długości fali $\lambda = 535$ wobec próby ślepej.

Do obliczeń ilości MDA wykorzystano wartość jego molowego współczynnika ekstynkcji wynoszącą $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3.8. Badanie komponenty białkowej mieliny

3.8.1. Oznaczanie stężenia białka

Stężenie białka oznaczano wg metody opisanej przez Lowry i wsp. (1951). Jako standard stosowano albuminę surowicy wołowej (79).

3.8.2. Elektroforeza białek w żelu poliakrylamidowym (SDS-PAGE)

Do prób mieliny zawierających 40 lub 80 μg białka dodawano 1/5 końcowej objętości pięciokrotnie zateżonego buforu (62,5 mM Tris-HCl o pH 6,8; 10% glicerol; 2% SDS; 1,5% β -merkaptotanol; 0,05% błękit bromofenolowy) i ogrzewano w temp. 65°C przez 20 min. Po schłodzeniu, próby nanoszono w całości do studzienek elektroforetycznych w żelu poliakrylamidowym (4% żel zagęszczający, 12% żel rozdzielający) wg metody Laemmli (1970) (69). Elektroforezę z chłodzeniem prowadzono ok. 4 godzin przy stałym natężeniu prądu 90 mA dla żelu zagęszczającego i 110 mA dla żelu rozdzielającego. Po elektroforezie żele były poddawane elektroblottingowi lub wybarwiane roztworem błękitu Coomassie.

3.8.3. Przenoszenie białek na membrany metodą elektroblottingu

Rozdzielone próby białkowe na żelach poliakrylamidowych były przenoszone metodą elektroblottingu (150) na błony nitrocelulozowe Hybond-ECL (Amersham). Transfer przeprowadzano w temperaturze 4°C w czasie 3 godzin przy stałym natężeniu prądu 70 mA, lub ok.16 godzin przy 50 mA. Efektywność przenoszenia białek po transferze sprawdzano poprzez wybarwienie żeli błękitem Coomassie i wybarwienie błon nitrocelulozowych czerwienią Ponceau.

3.8.4. Immunodetekcja metodą Western blot (immunoblotting)

Do detekcji białka CNP w próbach mielinowych zastosowano metodę wzmocnionej chemiluminescencji (ang. enhanced chemiluminescence – ECL) (Amersham). W badaniach użyto monoklonalne przeciwciało anty CNP (Sigma Immunochemicals) rozcieńczone 1:500 oraz anty-mysie drugorzędowe przeciwciała sprzężone z peroksydazą chrzanową, rozcieńczone 1:4000 (Amersham).

Do wstępnego blokowania jak i kolejnych inkubacji stosowano 5% roztwór odtłuszczonego mleka w buforze Tween 20 PBS (TPBS). Buforu TPBS używano do płukania membran (3 x 10min.) po kolejnych inkubacjach. Po transferze błonę nitrocelulozową

blokowano przez 1,5 godz. w temperaturze pokojowej. Następnie trzykrotnie płukano, po czym znakowano pierwszorzędowym przeciwciałem (1:500) przez 2 godz. w temperaturze pokojowej. Po trzykrotnym płukaniu, błonę nitrocelulozową znakowano drugorzędowymi mysimi przeciwciałami (1: 4000) przez 30 min. w temperaturze pokojowej. Autoradiografię na kliszach błon nitrocelulozowych przeprowadzono po trzykrotnym przepłukaniu (jak wyżej). Czas naświetlania klisz HyperfilmTM-ECL (Amersham) wynosił – 30 min.

3.8.5. Oznaczanie aktywności enzymatycznej CNPazy

Aktywność enzymatyczną CNPazy w próbach z homogenatów mieliny oznaczano wg metody opisanej przez Kurihara i Tsukada (68) z niewielkimi modyfikacjami (39, 40). Do prób zawierających odpowiednią ilość białka dodawano substrat – cykliczny adenozylo-2'3'-monofosforan i prowadzono inkubację w 37°C przez 15 min. Reakcję zatrzymywano szybkim schłodzeniem. Następnie próby nakładano na płytki krzemowe do chromatografii cienkowarstwowej (DC-Alurolle Silica Gel F₂₅₄) i rozwijano w układzie octanu etylu/propanolu/amoniaku/woda (90:60:40:30). Plamy odpowiadające substratowi i produktowi reakcji lokalizowano przy użyciu lampy UV, wycinano i eluowano w 4 ml 0,01M HCl. Absorbancję nadsącza odczytywano na spektrofotometrze (Beckman) przy $\lambda = 260$ nm wobec próby standardowej zawierającej odpowiednie stężenie substratu, nie poddanego działaniu enzymu. Aktywność specyficzną enzymu określano jako ilość μ moli produktu wytwarzanego w ciągu 1 minuty w temp. 37°C przez 1 mg białka.

3.8.6. Densytometria

Do oceny densytometrycznej żeli wykorzystano densytometr laserowy (UltraScan XL, Pharmacia LKB) i program komputerowy Gel Scan XL (Pharmacia LKB), natomiast do analizy densytometrycznej immunoblotów zastosowano program komputerowy Gel Expert 4.0.

3.8.7. Oznaczenie ilości grup sulfhydrylowych

Pomiar ilości grup sulfhydrylowych wykonywano wg metody Sedlak i Lindsay (118). Ilość białkowych grup SH (PB-SH) obliczano z różnicy pomiędzy całkowitą ilością grup SH (T-SH) a ilością niebiałkowych grup SH (NP-SH).

3.8.8. Oznaczenie całkowitej ilości grup SH (T-SH)

Do 50 μ l homogenatu dodawano 150 μ l 0,2M TRIS-HCl pH 8,2; 790 μ l 0,5% SDS w buforze 0,2 M TRIS-HCl i 10 μ l 0,01 M DTNB [kwas 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoesowy)]. Próba ślepa nie zawierała DTNB. Wszystkie próby inkubowano w temperaturze pokojowej przez 15 min., mieszając. Następnie po wirowaniu (3000 x g przez 15 min.) mierzono absorpcję prób przy $\lambda = 412$ wobec próby ślepej.

3.8.9. Oznaczenie ilości niebiałkowych grup SH (NP-SH)

Do 500 μ l homogenatu dodawano 100 μ l 50% TCA i wstrząsano 10-15 min. w temperaturze pokojowej. Po odwirowaniu (3000 g przez 15 min.) do supernatantu dodawano 0,4 M TRIS-HCl o pH 8,9 w stosunku 1:2. Następnie dodawano 25 μ l DTNB i w ciągu 5 min. mierzono absorpcję przy $\lambda = 412$ wobec próby ślepej odczynnikowej.

Ilość grup SH obliczano wg krzywej wzorcowej sporządzonej dla GSH (glutation zredukowany) w zakresie stężeń 1-10 x 10⁻⁵ M, wg procedury dla T-SH (opisanej wyżej).

3.9. Analiza statystyczna

Analiza statystyczną prezentowanych wyników przeprowadzano przy użyciu programu komputerowego Excel 4.0, stosując test t-Studenta. Wyniki przedstawiono jako średnie \pm odchylenie standardowe (SD). Znamienność statystyczną oznaczono odpowiednio $p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,001$.

4. WYNIKI

4.1. Zawartość Pb w organizmie szczura w wyniku przewlekłej ekspozycji

Wskaźnikiem wrażliwości i odpowiedzi organizmu na substancje toksyczne są specyficzne wskaźniki narażenia (biomarkery). Za podstawowy biomarker narażenia na toksyczne działanie ołowiu, jak już zaznaczono we wstępie, uznaje się stężenie tego pierwiastka we krwi (PbB). W tabeli 3 przedstawiono wyniki pomiaru poziomu ołowiu we krwi u zwierząt kontrolnych i poddanych działaniu Pb.

Tabela 3.

Poziom Pb we krwi szczurów kontrolnych i przewlekle eksponowanych na ołów.

Próba	Kontrola	Ekspozycja na Pb
<i>Krew ($\mu\text{g}/\text{dl}$)</i>	$1,9 \pm 1,0$ (6)	$30,60 \pm 12,0$ (7)

Wartości stanowią średnią \pm SD z ilości oznaczeń podanych w nawiasach ($p < 0,001$).

Ilość ołowiu oznaczana we krwi szczurów eksponowanych na ołów mieściła się w zakresie stężeń uważanych za niskie. Należy podkreślić, że występował duży rozrzut wyników oznaczeń wśród zwierząt zatrutych Pb, co może być potwierdzeniem indywidualnej wrażliwości na ten metal. W celu zbadania czy ołów przedostaje się z krwi do mózgu oznaczono jego zawartość w mózgach zwierząt badanych i kontrolnych. Porównawczo zbadano również ilość Pb w wątrobie i kościach szczurów uczestniczących w eksperymencie. Wyniki oznaczeń przedstawia Tabela 4.

Tabela 4.

Zawartość Pb w mózgu, wątrobie i kościach szczurów kontrolnych i przewlekle eksponowanych na ołów.

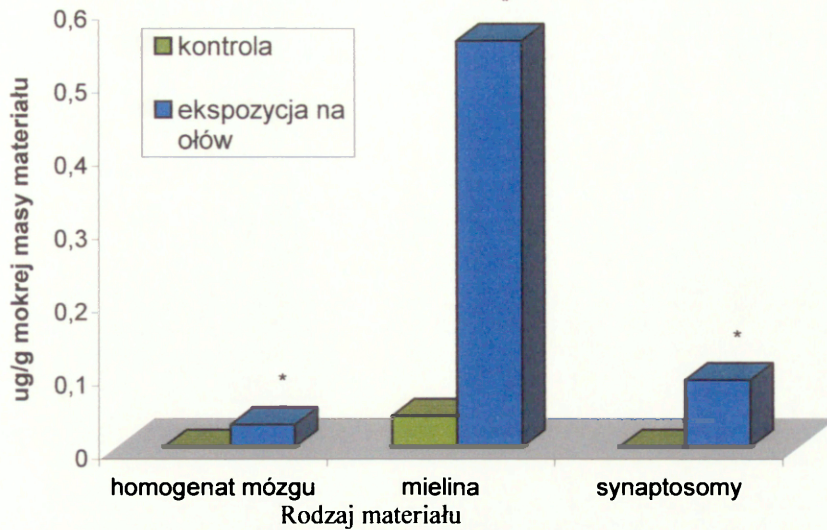
Rodzaj materiału	Kontrola ($\mu\text{g Pb/g}$ mokrej masy)	Ekspozycja na Pb ($\mu\text{g Pb/g}$ mokrej masy)
Mózg	0,019*(3)	$0,03 \pm 0,01$ (6)
<i>Wątroba</i>	0,019* (3)	$1,20 \pm 0,25$ (6)
Kość	0,019*(3)	$35,30 \pm 22,1$ (6)

Wartości stanowią średnią \pm SD z ilości oznaczeń podanych w nawiasach.

* wartość poniżej progu wykrywalności zastosowanej metody pomiaru.

Zaobserwowano wzrost poziomu Pb zarówno w mózgu jak i w wątrobie i kościach. Największe nagromadzenie Pb zaobserwowano w kościach, co jest charakterystyczne dla tkanki kostnej oraz przewlekłej ekspozycji. Najmniejsze ilości ołowiu występowały w mózgu.

Oceniano również jaka ilość Pb gromadzi się w badanej przez nas frakcji mielinowej mózgu oraz porównawczo we frakcji synaptosomalnej i homogenacie mózgowym. (Ryc.3)



Ryc. 3. Zawartość ołowiu w homogenacie mózgowym i izolowanych frakcjach: mielinowej i synaptosomalnej. Wartości stanowią średnie z 6 niezależnych oznaczeń. Wszystkie wartości w grupie eksponowanej są wyższe niż w grupie kontrolnej ($p < 0,05$).

Poziom ołowiu wzrasta w znacznie większym stopniu we frakcji mielinowej niż w homogenacie mózgowym czy frakcji synaptosomalnej o.u.n., co świadczy o jego większym powinowactwie do mieliny niż do innych struktur mózgu.

PODSUMOWANIE części pracy dotyczącej poziomu ołowiu we krwi, wybranych tkankach oraz frakcjach mózgowych po przewlekłej ekspozycji szczurów na ten metal.

Wykazano, że:

1. Ołów z przewodu pokarmowego szczurów przenikał do krwi w ilościach, które mieszczą się w zakresie stężeń uważanych raczej za niskie.
2. Ilość ołowiu obecna w homogenatach mózgu była stosunkowo niska w porównaniu z wątrobą czy kośćmi, jednakże badania frakcji mózgowych - mielinowej i synaptosomalnej otrzymanych z mózgow szczurów z dojrzałą barierą krew/mózg wykazały znaczną zdolność gromadzenia tego metalu.

- Większa ilość Pb nagromadzona w mielinie w porównaniu do homogenatu mózgu i synaptosomów świadczy o większym powinowactwie ołowiu do tej struktury mózgu.

4.2. Ocena morfologiczna frakcji mielinowej izolowanej z mózgów szczurów kontrolnych i poddanych przewlekłej ekspozycji na ołów

Wyraźne podwyższenie poziomu ołowiu w mielinie o.u.n. szczura na skutek przewlekłej ekspozycji na ołów nasuwało pytanie, czy wpływa on na strukturę błon mielinowych?

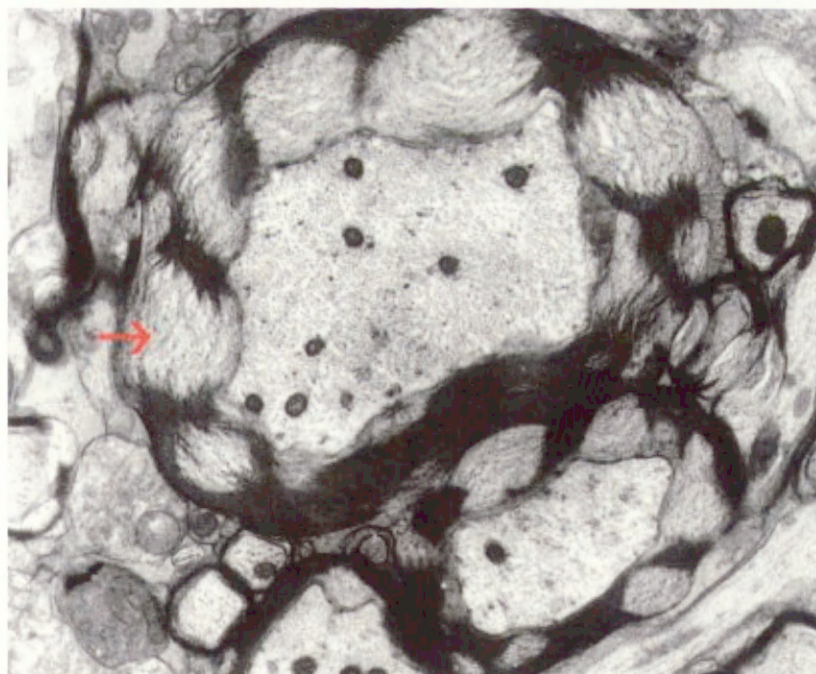
W celu wyjaśnienia tego problemu porównywano preparaty mieliny otrzymane ze zwierząt kontrolnych i ze zwierząt pojonych wodą z ołowiem i oceniano pod mikroskopem elektronowym budowę mieliny w skrawkach pobranych od zwierząt kontrolnych i badanych z pogranicza istoty szarej i białej.

Typowy obraz osłonki mielinowej „kontrolnej” na elektrogramach charakteryzuje się koncentrycznie, naprzemiennie i dość ściśle ułożonymi blaszkami ciemnymi elektronowo-gęstymi, oddzielonymi od siebie obszarem o małej gęstości elektronooptycznej. (Ryc. 4). Wewnątrz włókna nerwowego widoczne są neurotubule o prawidłowej budowie.

U zwierząt eksponowanych na ołów zaobserwowano zmiany morfologiczne w strukturze blaszek tworzących osłonki mielinowej. Zmiany te charakteryzowały się licznymi odcinkami rozluźnionych, rozwarstwionych blaszek osłonki mielinowej (Ryc. 5).



Ryc. 4. Obraz mikroskopowo-elektronowy osłonki mielinowej szczura kontrolnego; powiększenie x 60 000. (→ - mielina)



Ryc. 5. Obraz mikroskopowo-elektronowy osłonki mielinowej szczura eksponowanego przewlekłe na ołów; powiększenie x 40 000. (→ - mielina)

W obrazach mikroskopowo-elektronowych poszczególne osłonki włókien nerwowych różniły się ilością zmienionych patologicznie odcinków. W celu ilościowego porównania zmian w poszczególnych osłonkach mielinowych po ekspozycji ołowiowej przeprowadzono analizę morfometryczną profili tych osłonek. Zliczano ilość zmienionych miejsc w obrębie każdej oddzielnej osłonki i podzielono te zmiany na trzy grupy:

grupa I - osłonki mielinowe bardzo zmienione (liczne miejsca uszkodzeń, powyżej 5 w obrębie jednej osłonki),

grupa II - osłonki mielinowe częściowo zmienione (1-5-ciu zmienionych miejsc w obrębie jednej osłonki, w tym łagodniejsze zmiany ultrastrukturalne ograniczające się do rozluźnienia upakowania błon),

grupa III - osłonki mielinowe niezmienione (brak zmian na poziomie ultrastrukturalnym - obraz taki sam jak w przypadku preparatów kontrolnych).

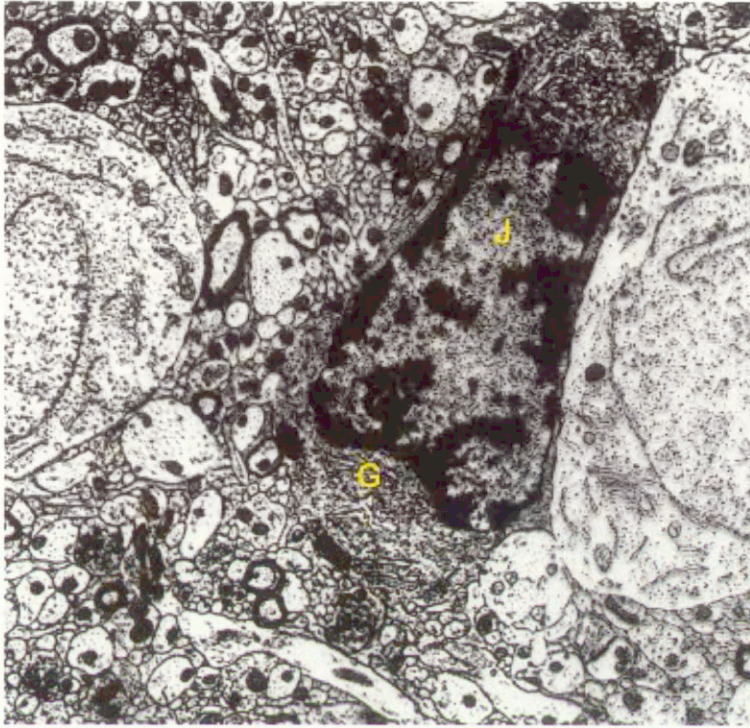
Przeprowadzona analiza morfometryczna 50 profili osłonek mielinowych wybranych losowo wykazała, że osłonki mielinowe bardzo zmienione (grupa I) stanowią 20%, osłonki mielinowe częściowo zmienione (grupa II) stanowią 70%, a osłonki niezmienione (grupa III) jedynie 10% wszystkich ocenianych profili osłonek mielinowych.

4.3. Ocena morfologiczna oligodendrocytów w mózgach szczurów kontrolnych i poddanych przewlekłej ekspozycji na ołów

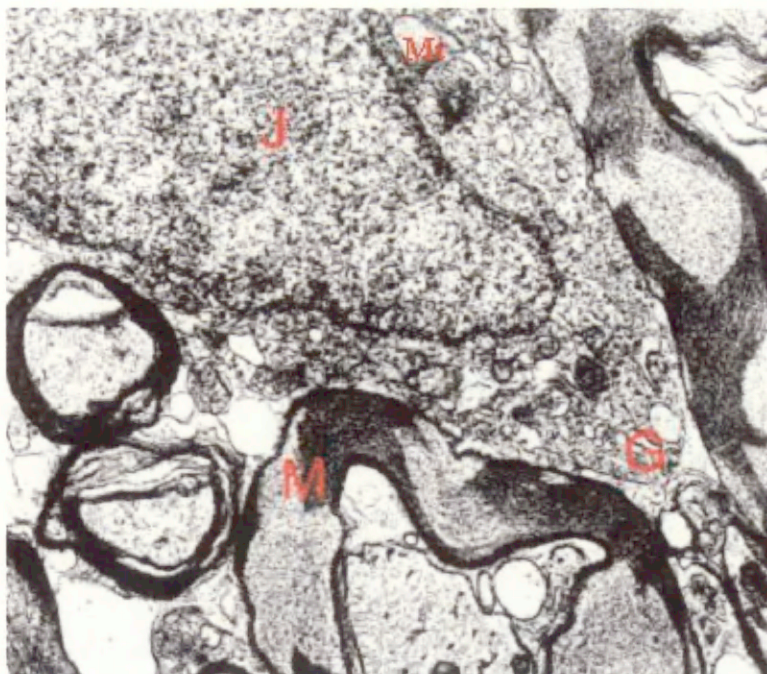
Wyniki badań mikroskopowo-elektronowych ultracienkich skrawków pochodzących z mózgów szczurów eksponowanych przewlekłe na ołów wykazały zmiany w oligodendrocytach – komórkach odpowiedzialnych za wytwarzanie mieliny.

Zmiany te dotyczyły zarówno struktury jądra jak i cytoplazmy (Ryc. 6, 7). Chromatyna jądrowa uległa rozproszeniu, nie widywano struktur jąderkowych. Strefa aparatu Golgiego była ograniczona do pojedynczych cystern oraz nielicznych pęcherzyków. Wiele

mitochondriów wykazywało cechy obrzmienia. W cytoplazmie obserwowano również wolne rybosomy nie związane z kanałami siateczki śródplazmatycznej.



Ryc. 6. Obraz mikroskopowo-elektronowy mózgu szczura kontrolnego; powiększenie x 15000. (J-jądro kom. oligodendrocytarnej, G-aparat Golgiego)



Ryc. 7. Obraz mikroskopowo-elektronowy mózgu szczura eksponowanego przewlekłe na ołów; powiększenie x 35000. (J-jądro kom. oligodendrocytarnej, G- aparat Golgiego, Mt-mitochondrium, M-osłonka mielinowa)

PODSUMOWANIE części pracy dotyczącej zmian morfologicznych w osłonkach mielinowych i oligodendrocytach mózgu szczura po przewlekłej ekspozycji zwierząt na ołów.

W badaniach mikroskopowo-elektronowych wykazano, że ołów przedostający się do mózgu szczurów w czasie ich przewlekłej ekspozycji na ten pierwiastek powoduje:

1. Istotne zmiany w budowie osłonek mielinowych przemawiające za głęboką patologią
2. Liczne zmiany morfologiczne w budowie oligodendrocytów.

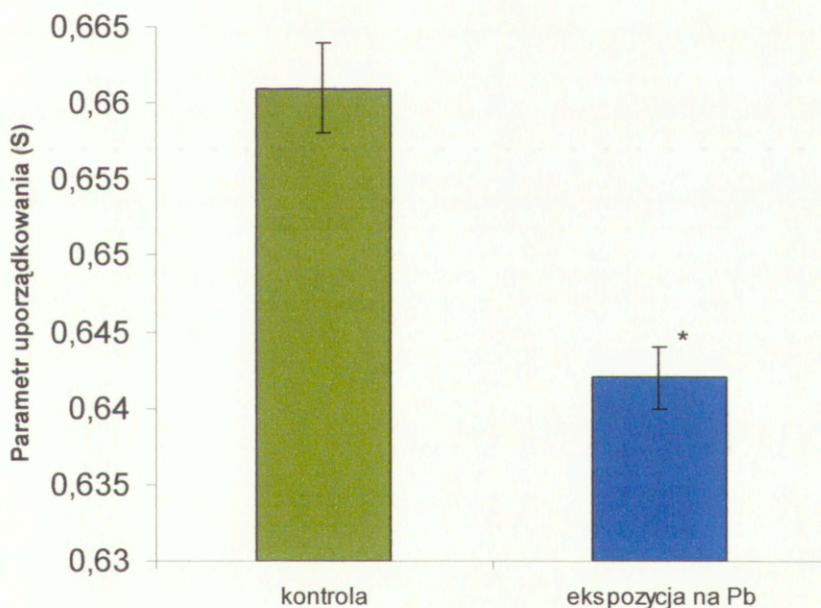
4.4. Wpływ ołowiu na stan płynności błon mieliny

4.4.1. Ocena stanu płynności błon mieliny techniką EPR

Obserwowane zmiany morfologiczne w strukturze osłonki mielinowej u zwierząt zatrutych ołowiem nasuwały pytanie: „W jaki sposób może dochodzić do tak znacznych uszkodzeń blaszek mielinowych, czy bezpośrednią przyczyną może być zaburzenie płynności błon?” Aby odpowiedzieć na powyższe pytania podjęto szereg fizykochemicznych badań. Zastosowano technikę Elektronowego Rezonansu Paramagnetycznego (EPR) dokładnie

opisaną w rozdziale Metody (nr 3.5.1.). Postanowiono sprawdzić, czy ołów wpływa na ruchliwość łańcuchów węglowodorowych w hydrofobowym rejonie błon mieliny. Uzyskane wyniki umożliwiły wyliczenie parametru uporządkowania (S) błon mieliny znakowanych znacznikiem spinowym (estrem metylowym kwasu 5-doksylostearynowego). Parametr ten służy do oceny stanu błon. Im mniejsza jest jego wartość, tym większe nieuporządkowanie.

U zwierząt poddanych przewlekłej ekspozycji na ołów stwierdzono obniżenie parametru uporządkowania, co oznacza wzrost płynności błon mielinowych u tych zwierząt. Obserwowany spadek był istotny statystycznie. Dane doświadczalne odznaczały się niskim odchyleniem standardowym $p < 0.01$. Tak więc uzyskane wyniki wskazują na zwiększoną płynność błon mielinowych u zwierząt przewlekłe ekspozycyjnych na ołów. (Ryc. 8)

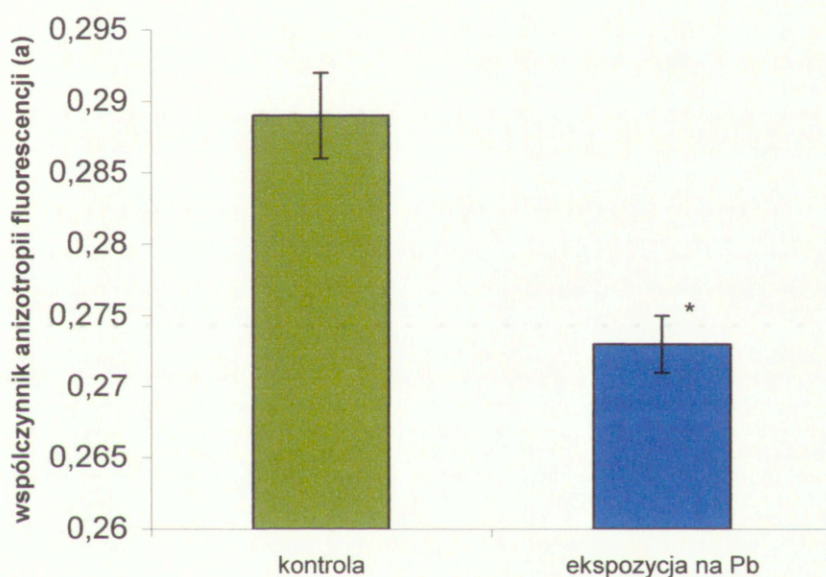


Ryc. 8. Wpływ ołowiu na parametr uporządkowania lipidów wyznaczony z widma EPR znacznika estru metylowego kwasu 5'-doksylostearynowego. Diagramy reprezentują średnie \pm SD z 7 niezależnych pomiarów (* $p < 0,01$).

4.4.2. Ocena stanu płynności błon mieliny metodą spektrofluorymetryczną

Zmiany płynności błon mieliny oznaczono dodatkowo metodą spektrofluorymetryczną (Metody nr 3.5.2.), używając znacznika fluorescencyjnego 1,6-difenylo-1,3,5-heksatrienu (DPH). Związek ten dostarcza informacji o lepkości wewnętrznej warstwy lipidowej błony.

Wartości współczynnika fluorescencji (a), będącego miarą płynności dwuwarstwy lipidowej błony komórkowej, wyznaczone dla mieliny zwierząt eksponowanych na ołów i kontrolnych zostały przedstawione na Ryc. 9.



Ryc. 9. Współczynnik anizotropii fluorescencji dla znacznika DPH w mielinie otrzymanej ze zwierząt kontrolnych i eksponowanych na Pb. Diagramy reprezentują średnie \pm SD z 7 niezależnych pomiarów.

Wartość współczynnika anizotropii fluorescencji (a) wyznaczona dla zwierząt zatrutych ołowiem uległa obniżeniu w porównaniu z wartością kontrolną. Spadek wartości współczynnika anizotropii był statystycznie znamienne przy $p < 0.01$.

Podobnie jak w przypadku pomiarów techniką EPR otrzymano wynik świadczący o zwiększeniu płynności błon mielinowych u zwierząt przewlekle eksponowanych na ołów.

PODSUMOWANIE części pracy dotyczącej badań fizykochemicznych określających płynność błon mieliny u szczurów kontrolnych i przewlekle eksponowanych na ołów.

1. Badania metodami EPR i spektrofluorymetryczną dostarczyły dowodów na zaburzenia płynności błon mieliny (zwiększenie płynności) w warunkach przewlekłej ekspozycji na ołów.
2. Zwiększenie płynności błon mieliny może być bezpośrednim czynnikiem sprawczym obserwowanych zmian morfologicznych.

4.5. Poszukiwanie biochemicznych, molekularnych mechanizmów odpowiedzialnych za zaburzenia płynności błon mieliny w warunkach przewlekłej ekspozycji na ołów

Płynność błon zależy od wielu czynników takich jak: stosunek białek i lipidów w błonie, stosunek nasyconych i nienasyconych kwasów tłuszczowych, zawartość cholesterolu, rozkład glikolipidów, czy ilość jonów związanych z błonami.

Biorąc pod uwagę obserwowane w niniejszej pracy zmiany morfologiczne oraz zwiększoną płynność błon mieliny w warunkach zatrucia ołowiem, postanowiono poszukać biochemicznych, molekularnych mechanizmów odpowiedzialnych za te zmiany. Uwagę skupiono na dwu podstawowych komponentach błon:

lipidowej – oceniając wpływ przewlekłego działania niskich dawek ołowiu na peroksydację lipidów oraz na ilościowy i jakościowy skład fosfolipidów i cholesterolu;

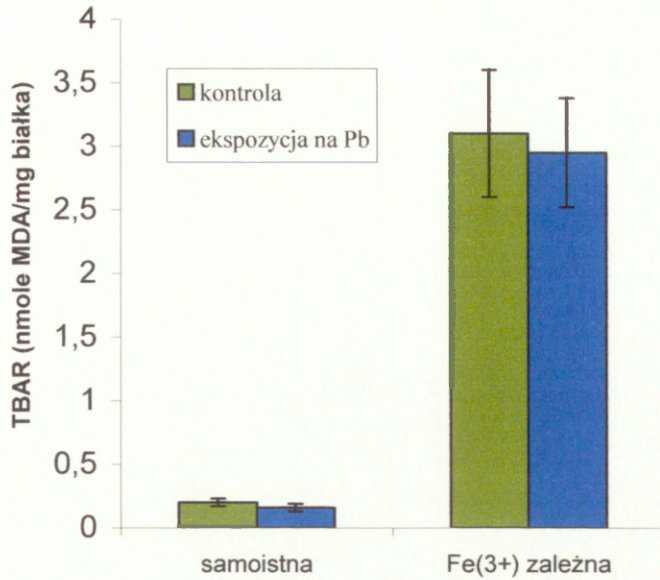
białkowej – określając toksyczną rolę ołowiu w ilościowej i jakościowej zawartości białek mieliniowych, poziomie grup –SH oraz aktywności (kinetyki) i immunodetekcji CNP-azy - specyficznego enzymu mieliny.

4.5.1. Komponenta lipidowa mieliny szczurów a przewlekłe zatrucie ołowiem

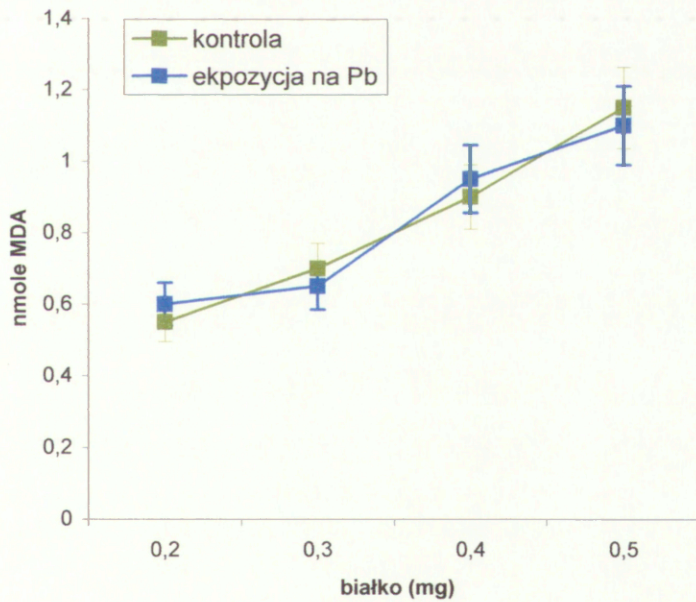
4.5.1.1. Wpływ przewlekłego zatrucia ołowiem na procesy peroksydacyjne w mózgu

Z literatury wiadomo, że peroksydacja lipidów prowadzi do zmian struktury błony komórkowej wywołanej przez atak wolnych rodników tlenowych na kwasy tłuszczowe. Wiadomo też, że substancje toksyczne są jednym z czynników, które uruchamiają bądź wzmagają procesy wolnorodnikowego utleniania oraz, że ołów wzmagają żelazozależną peroksydację w wątrobie, erytrocytach i surowicy. Wydawało się zasadne sprawdzenie, czy przewlekłe zatrucie ołowiem powoduje wzmożenie peroksydacji lipidów w mózgu, co mogłoby być jednym z mechanizmów prowadzących do obserwowanych przez nas zmian w budowie otoczek mielinowych i płynności mieliny.

Badania stężenia wskaźnika peroksydacji lipidów – aldehydu malonylowego (MDA) w preparatach mieliny o.u.n. nie wykazały statystycznie znamiennych różnic pomiędzy mielina otrzymaną ze zwierząt kontrolnych i zatrutych ołowiem. Ołów nie indukował procesów peroksydacyjnych (peroksydacja samoistna), ani też nie wykazywał wpływu na żelazozależną peroksydację w preparatach mieliny w żadnym z badanych stężeń białka Ryc. 10, Ryc.11.

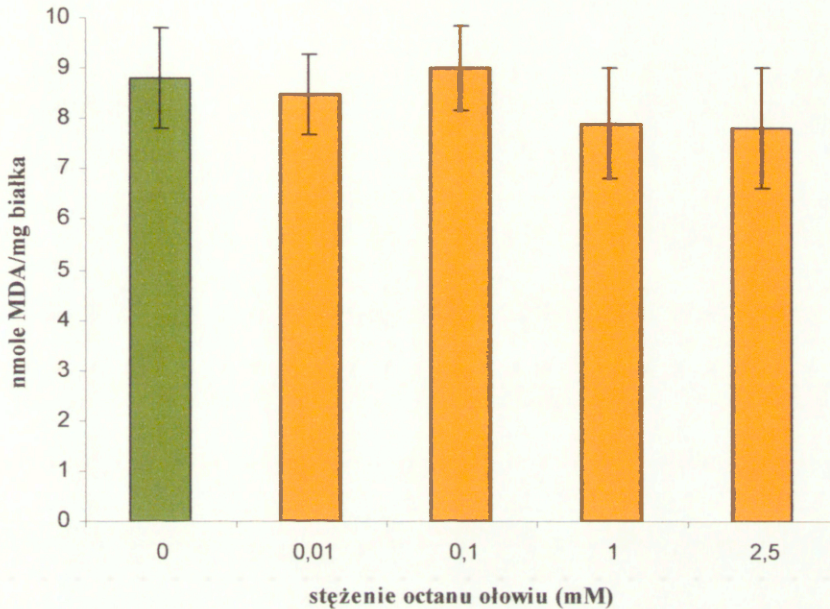


Ryc. 10. Perokсыdacja samoistna i Fe³⁺ zależna w preparatach mieliny otrzymanych ze szczurów kontrolnych i ekspozowanych na ołów. Wartości są średnimi ±SD z 6 doświadczeń. Różnice statystycznie nieznaczne (p>0,05).



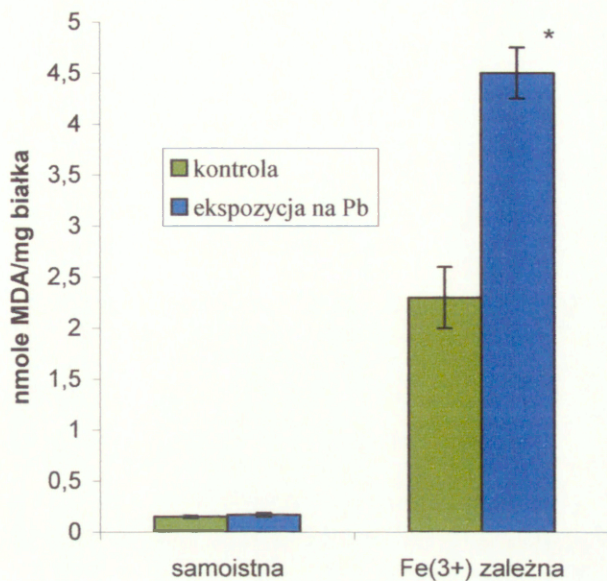
Ryc. 11. Perokсыdacja Fe³⁺ - zależna w preparatach mieliny otrzymanych ze szczurów kontrolnych i ekspozowanych na ołów w zależności od stężenia białka. Wyniki są średnimi ± SD z czterech doświadczeń (p>0,05).

Brak wzmożenia procesów wolnorodnikowego utleniania lipidów w mielinie w przewlekłej toksyczności ołowiowej *in vivo* przy niskich stężeniach ołowiu w mózgu potwierdzają badania *in vitro*, w których nawet duże stężenia octanu ołowiu nie powodują zwiększenia Fe^{3+} zależnej peroksydacji w homogenatach mózgu. (Ryc. 12)



Ryc. 12. Peroksydacja Fe^{3+} w homogenatach mózgu w badaniach *in vitro* w zależności od stężenia octanu ołowiu. Dane są średnimi \pm SD z dziewięciu oznaczeń. ($p > 0,05$).

Porównawczo zbadano wpływ przewlekłego zatrucia ołowiem na peroksydację lipidów w homogenatach wątroby gdzie w przeciwieństwie do mielin wykazano istotny wzrost peroksydacji żelazozależnej (Ryc. 13).



Ryc. 13. Peroksydacja samoistna i Fe³⁺ zależna w homogenatach wątroby otrzymanych ze szczurów kontrolnych i eksponowanych na ołów. Wyniki są średnią \pm SD z trzech doświadczeń, * p<0,001.

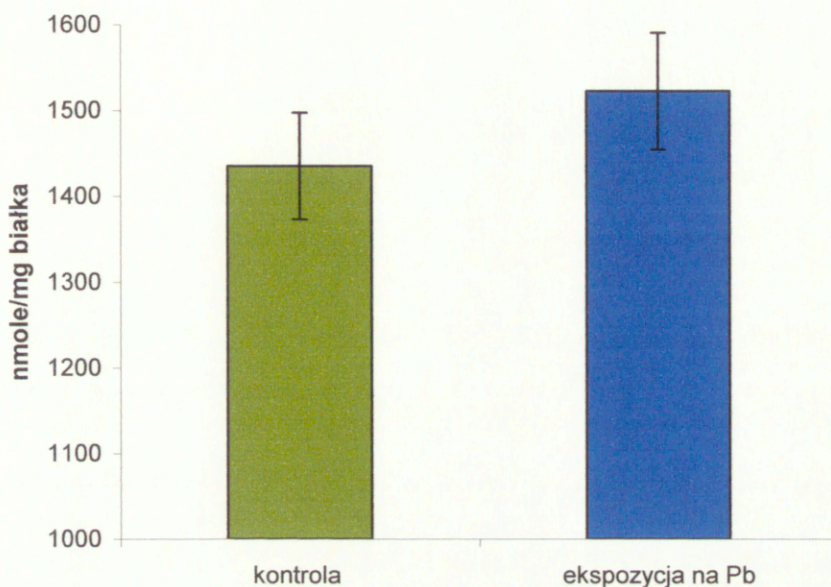
PODSUMOWANIE części pracy dotyczącej peroksydacji lipidów mielin o.u.n. otrzymanej z mózgow szczurów kontrolnych i poddanych przewlekłej ekspozycji na ołów.

Ołów zarówno w przewlekłym narażeniu *in vivo*, jak również w doświadczeniach *in vitro* nie indukował procesów peroksydacyjnych (peroksydacja samoistna) ani też nie wywierał wpływu na Fe³⁺ zależną peroksydację lipidów mielin mózgu w przeciwieństwie do homogenatów wątroby gdzie obserwowano istotny wzrost peroksydacji w przewlekłej toksyczności ołowiowej.

4.5.1.2. Wpływ przewlekłego zatrucia ołowiem na poziom cholesterolu w mielinie o.u.n.

Znaczny wpływ na płynność błon biologicznych wywiera obecność i poziom zawartego w nich cholesterolu, który zawiera w swojej cząsteczce obszerny rdzeń steroidowy z grupą

hydroksylową i elastyczny „ogon” węglowodorowy. Porównanie całkowitego stężenia cholesterolu w izolowanych frakcjach mielinowych otrzymanych ze zwierząt przewlekle zatrutych ołowiem i kontrolnych nie wykazało jednak istotnych różnic pomiędzy obydwoma grupami. (Ryc. 14)



Ryc. 14. Zawartość cholesterolu w mielinie otrzymanej ze zwierząt kontrolnych i eksponowanych na ołów. Wyniki stanowią średnie \pm SD z pięciu niezależnych doświadczeń ($p > 0,05$).

Poziom cholesterolu praktycznie nie zmieniał się pod wpływem przewlekłego zatrucia ołowiem. Niewielkie różnice były statystycznie nieznamienne.

4.5.1.3. Wpływ przewlekłego zatrucia ołowiem na komponentę fosfolipidową mieliny

Badanie poziomu fosfolipidów całkowitych we frakcjach mielinowych wyizolowanych ze zwierząt eksponowanych na ołów nie wykazało statystycznie znamienych różnic w ich ilości w porównaniu do kontroli (Tabela 5).

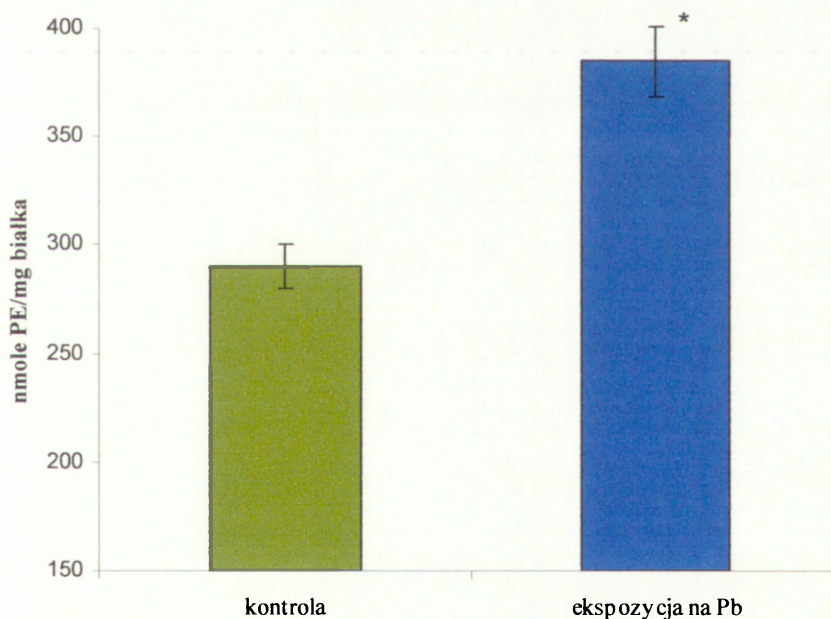
Tabela 5.

Wpływ Pb na całkowitą zawartość fosfolipidów we frakcji mielinowej.

Całkowite fosfolipidy (nmole/mg białka)	
<i>Kontrola</i>	<i>Ekspozycja na Pb</i>
1035,0 ± 100,1	1070,2 ± 105,8

Dane są średnimi z 6 różnych doświadczeń. Różnice statystycznie nieznamiennie ($p > 0,05$).

Oznaczając poziom poszczególnych klas fosfolipidów, otrzymanych po rozdziale chromatograficznym, zaobserwowano istotne zmiany w ilości fosfatydyloetanolaminy (PE) między próbkami kontrolnymi i badanymi (Ryc. 15).



Ryc. 15. Poziom PE w mielinie kontrolnej i otrzymanej ze zwierząt zatrutych ołowiem. Wartości są średnimi ± SD z 6 niezależnych doświadczeń, * $p < 0,05$.

Poziom PE w mielinie zwierząt zatrutych ołowiem był większy w porównaniu z kontrolą, a różnica ta była statystycznie znamienne. W pozostałych klasach fosfolipidów nie odnotowano statystycznie znamienych ilościowych różnic (Tabela 6).

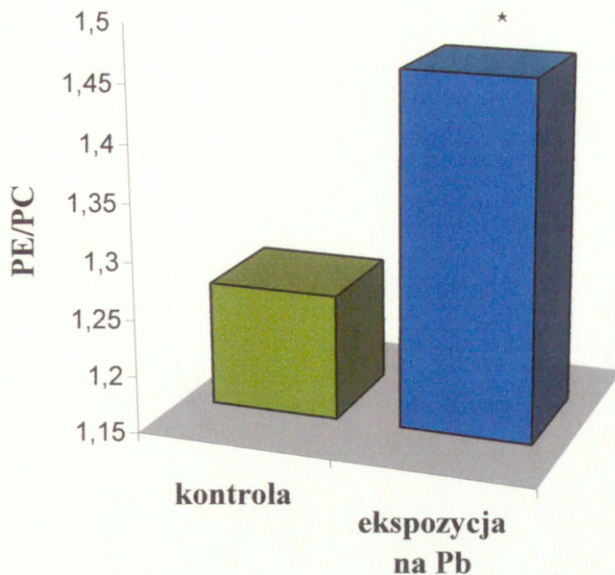
Tabela 6.

Zawartość fosfolipidów w mielinie otrzymanej ze zwierząt kontrolnych i przewlekle eksponowanych na ołów.

<i>Fosfolipid</i>	<i>Kontrola</i> (nmole/mg białka)	<i>Ekspozycja na Pb</i>
SM	61,0 ± 2,2	74 ± 12,9
PS	131,0 ± 19,2	138,1 ± 12,0
PI	45,0 ± 10,5	50,1 ± 19,8
PC	264,0 ± 31,0	257,0 ± 21,2

Dane są średnimi ± SD z 6 niezależnych doświadczeń. Różnice statystycznie nieznamiennie. $p > 0,05$ (SM - sfingomielina, PS - fosfatydyloseryna, PI - fosfatydyloinozytol i PC – fosfatydylocholina)

Na ryc.16 przedstawiono różnice stosunku PE/PC w mielinie kontrolnej i otrzymanej ze zwierząt eksponowanych na ołów.



Ryc. 16. Wpływ ołowiu na proporcję PE/PC w mielinie otrzymanej z mózgow zwierząt kontrolnych i eksponowanych na ołów, * $p < 0,05$.

PODSUMOWANIE części pracy dotyczącej wpływu przewlekłego zatrucia ołowiem na cholesterol i komponentę fosfolipidową mieliny.

1. Ołów nie powodował zmian w poziomie cholesterolu będącego składową błon mieliny.
2. W warunkach zatrucia ołowiem zaobserwowano statystycznie znamiennej wzrost fosfatydyloetanolaminy przy braku zmian w ilości innych badanych fosfolipidów.
3. Powyższe zmiany prowadziły do wzrostu stosunku PE/PC.

4.5.2. Ocena komponenty białkowej mieliny szczurów kontrolnych i zatrutych ołowiem

Wiadomo, że zwiększenie zawartości PE w stosunku do PC, przy jednoczesnym obniżeniu ilości grup –SH może prowadzić do utraty asymetrii błon oraz powstawania domen lipidowych połączonych z tworzeniem mostków siarczkowych, co skutkuje destabilizacją dwuwarstwy i zmianą oddziaływań lipid-białko. Wiadomo również, że metale ciężkie mają

duże powinowactwo do białkowych grup sulfhydrylowych (-SH). Dotychczas jednakże brak było danych dotyczących wpływu ołowiu na ilość grup -SH w mielinie.

Zbadano zatem poziom grup -SH we frakcjach mielinowych otrzymanych ze szczurów kontrolnych i po ekspozycji na Pb.

4.5.2.1. Wpływ ołowiu na stężenie niebiałkowych i białkowych grup -SH w mielinie zwierząt kontrolnych i przewlekle zatrutych ołowiem

Ilość niebiałkowych grup -SH kształtowała się na niskim poziomie i była podobna w obydwu grupach zwierząt (eksponowanej na ołów i kontrolnej) (Tabela 7).

Tabela 7.

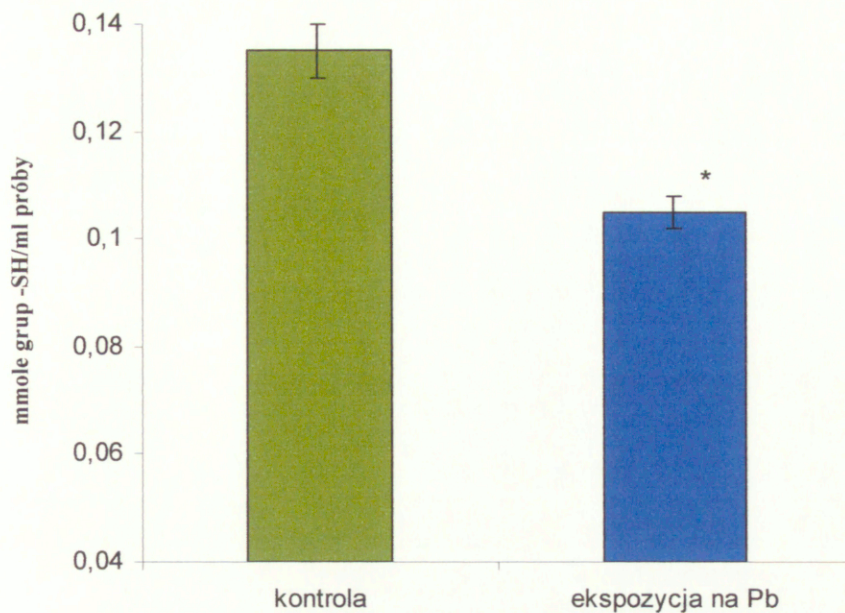
Zawartość niebiałkowych grup SH we frakcji mielinowej szczurów kontrolnych i zatrutych ołowiem.

Stężenie niebiałkowych grup SH (nmole/ml próby)

<i>Kontrola</i>	<i>Ekspozycja na Pb</i>
0,009 ± 0,003	0,008 ± 0,002

Wartości stanowią średnie ± SD z 4 niezależnych eksperymentów. Różnice statystycznie nieznamiennie. $p > 0,05$

W przypadku białkowych grup -SH we frakcjach mielinowych uzyskanych z obydwu grup szczurów występowały wyraźne różnice. W mielinie mózgow zwierząt zatrutych ołowiem, stężenie białkowych grup -SH obniżało się o 20% w porównaniu do wartości kontrolnych (Ryc. 17).



Ryc. 17. Poziom białkowych grup -SH w mielinie kontrolnej i w mielinie otrzymanej ze zwierząt zatrutych ołowiem. Wartości są średnimi \pm SD z 6 niezależnych doświadczeń, * $p < 0,05$.

4.5.2.2. Wpływ przewlekłej ekspozycji na ołów na całkowite stężenie białka w mielinie

Wyraźnie zaznaczony spadek ilości białkowych grup -SH we frakcji mielinowej otrzymanej ze zwierząt eksponowanych na ołów, nasuwał pytanie, czy ilość białek mielinowych również się zmienia. W tym celu z homogenatów mózgowych szczurów zatrutych ołowiem i kontrolnych wyizolowano frakcje mielinowe, a następnie dokonano pomiaru całkowitego stężenia białka. Otrzymane wartości dla grupy eksponowanej na Pb nie różniły się w porównaniu z grupą kontrolną. (Tabela 8)

Tabela 8.**Wpływ Pb na całkowitą zawartość białek we frakcji mielinowej.**

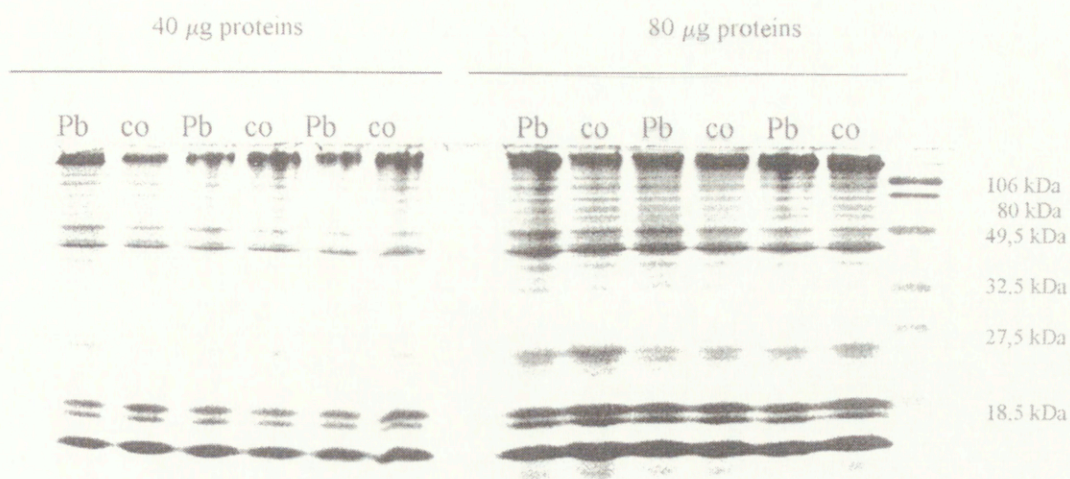
Calkowite bialko (mg/g mózgowia)	
<i>Kontrola</i>	<i>Ekspozycja na Pb</i>
7,31 ± 1,18	7,25 ± 0,97

Wartości stanowią średnie ± SD z 6 niezależnych eksperymentów. Różnice są statystycznie nieznamienne. $p > 0,05$

4.5.2.3. Skład białkowy mieliny ośrodkowego układu nerwowego u zwierząt eksponowanych na ołów

Mimo, że porównanie całkowitego stężenia białek w wyizolowanych frakcjach mielinowych szczurów z obydwu grup eksperymentalnych nie wykazało różnic, postanowiono określić skład białek mielinowych. W tym celu przeprowadzono rozdział elektroforetyczny białek frakcji mielinowych w żelu poliakrylamidowym.

Utrwalone żele zostały poddawane obróbce densytometrycznej, z wykorzystaniem programu komputerowego Gel-Scan. W rozdzielach elektroforetycznych białek nie zaobserwowano istnienia wyraźnych różnic ani w ilości, ani w składzie białkowym mieliny otrzymanej ze zwierząt eksponowanych na ołów w porównaniu z kontrolą. Analiza densytometryczna otrzymanych żeli nie wykazała statystycznie znamienych różnic (Ryc. 18).

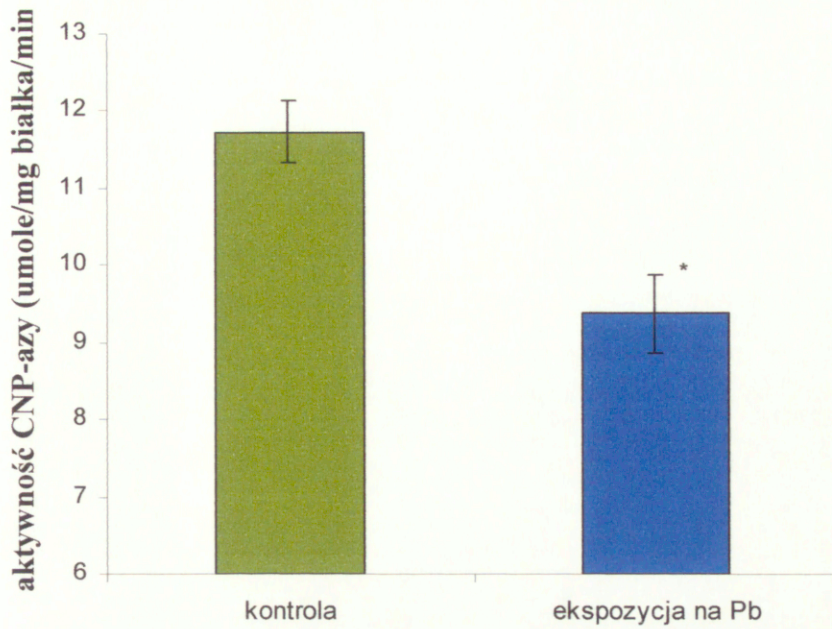


Ryc. 18. Reprezentatywne zdjęcie rozdzału elektroforetycznego (SDS-PAGE) białek mieliny mózgu szczura kontrolnego (co) i poddanego przewlekłej ekspozycji na ołów (Pb), po wybarwieniu błękitem Coomassie.

Zatem jednocześnie ze zmniejszeniem ilości grup –SH nie zaobserwowano statystycznie znamiennych różnic w ilości poszczególnych białek mielinowych, po ekspozycji na Pb. Istniała jednak możliwość, że zmniejszenie poziomu białkowych grup –SH może wpływać na zmiany w aktywności części enzymów, które posiadają grupy sulfhydrylowe. Jak podano we wstępie specyficznym enzymem mieliny jest CNPaza spełniająca prawdopodobnie rolę transportera składników mieliny. Postanowiono sprawdzić czy i na ile przewlekłe zatrucie ołowiem modyfikuje aktywność tego enzymu oraz wpływa na ilość tego białka w mielinie.

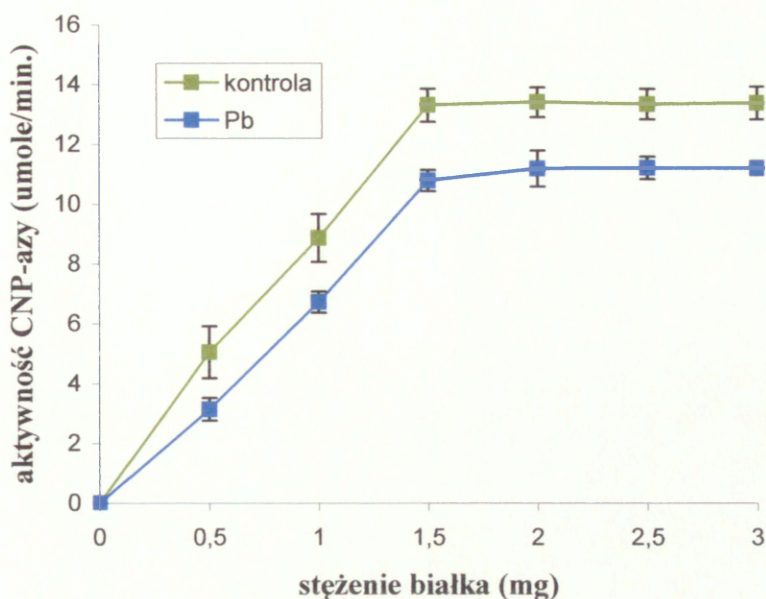
4.5.2.4. Wpływ ołowiu na aktywność 2'3'cyklicznej nukleotydo-3'fosfodiesterazy (CNP-azy)

Wyniki pomiaru specyficznej aktywności enzymatycznej CNP-azy we frakcji mielinowej wykazały jej obniżenie w grupie eksponowanej na ołów, sięgające ok. 20%. (Ryc. 19).

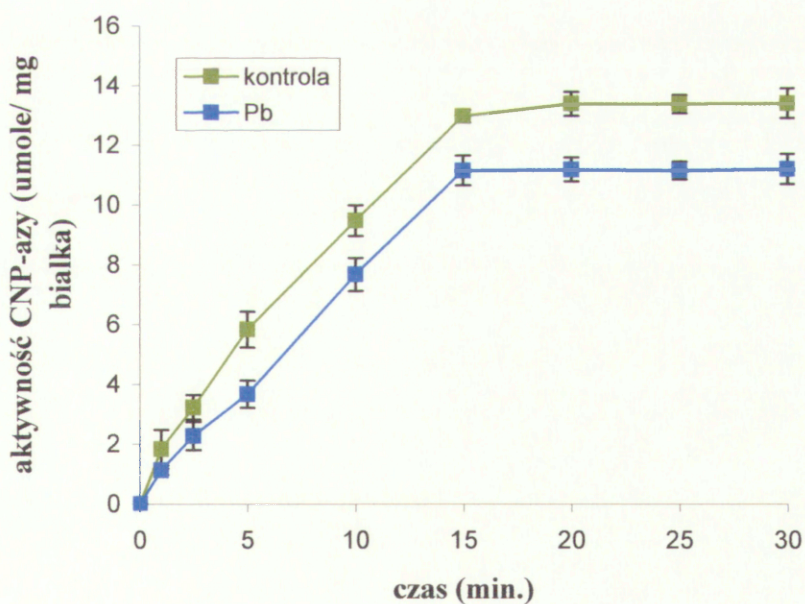


Ryc. 19. Aktywność CNP-azy w mielinie izolowanej ze zwierząt kontrolnych i zatrutych ołowiem. Wartości prezentują średnią \pm SD z siedmiu niezależnych doświadczeń, * $p < 0,05$.

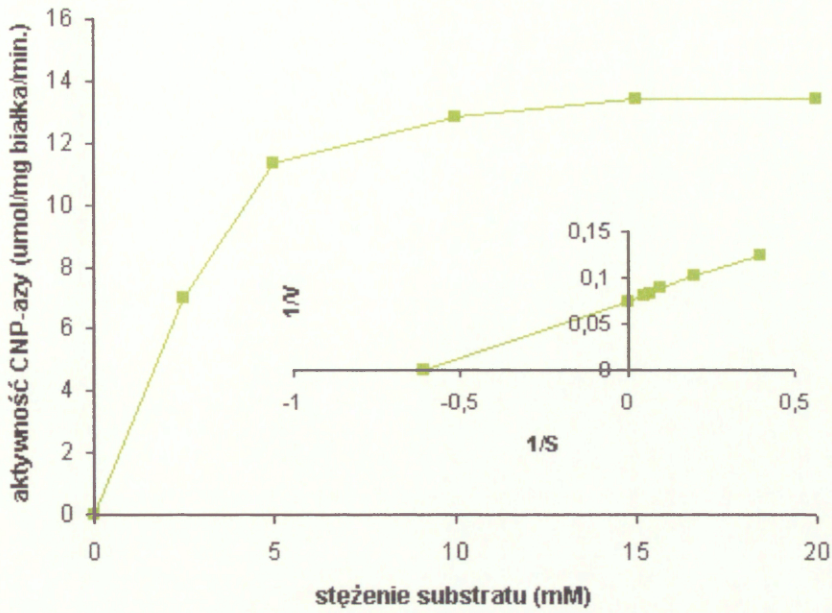
Aktywność enzymatyczna CNP-azy jest zależna od stężenia białka (Ryc. 20), czasu inkubacji (Ryc. 21) oraz stężenia substratu (Ryc. 22 A, B), zgodnie z modelem kinetycznym Michaelisa-Menten.



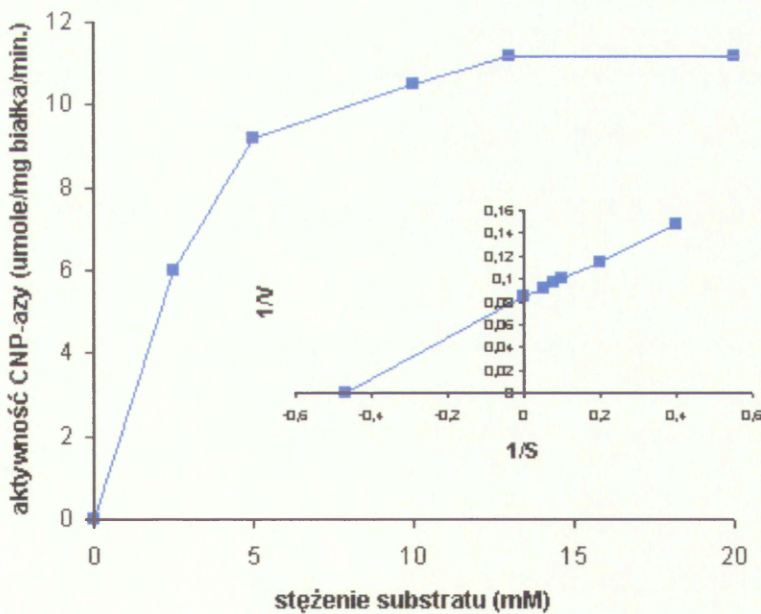
Ryc. 20. Aktywność CNP-azy w różnych stężeniach białka w mielinie otrzymanej ze zwierząt kontrolnych i zatrutych Pb. Wartości prezentują średnią \pm SD z czterech niezależnych doświadczeń, $p < 0,05$.



Ryc. 21. Aktywność CNP-azy w mielinie otrzymanej ze zwierząt kontrolnych i zatrutych Pb jako funkcja czasu. Każdy punkt stanowi średnią arytmetyczną \pm SD z 5 niezależnych doświadczeń, $p < 0,05$.



Ryc. 22A. Aktywność CNP-azy w mielinie kontrolnej jako funkcja stężenia substratu. Każdy punkt reprezentuje średnią z pięciu niezależnych doświadczeń, SD <5%.



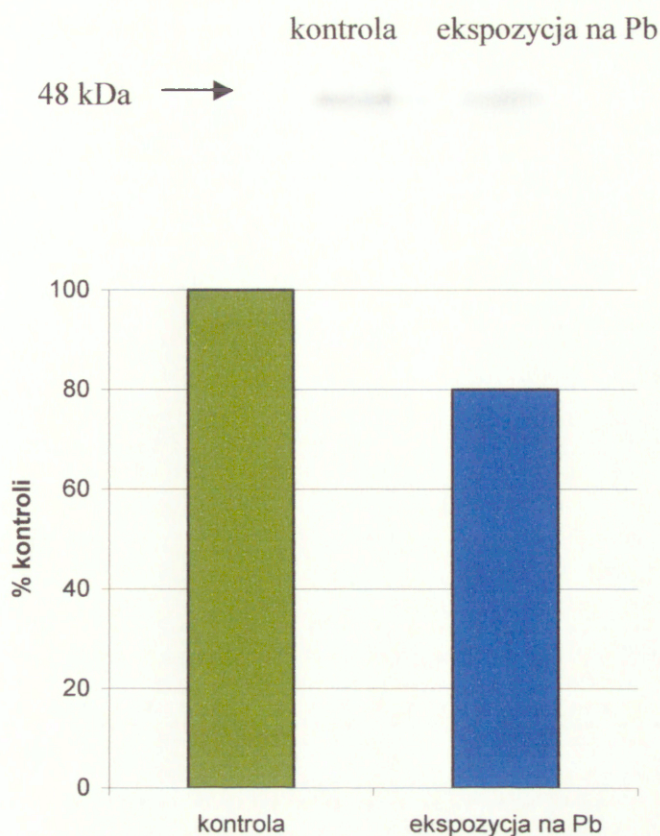
Ryc. 22B. Aktywność CNP-azy w mielinie zwierząt zatrutych ołowiem jako funkcja stężenia substratu. Każdy punkt reprezentuje średnią z pięciu niezależnych doświadczeń, SD <5%.

V_{\max} oznacza szybkość reakcji w warunkach całkowitego wysycenia enzymu substratem. Stała Michaelisa (K_M) jest równa takiemu stężeniu substratu, dla którego szybkość reakcji (V) osiągnęła połowę swojej wartości maksymalnej ($V = V_{\max} / 2$). Z badań niniejszej pracy wynika, że K_M dla CNPazy w warunkach kontrolnych wynosi 1,64 mM, a $V_{\max} = 13,4 \mu\text{mol} / \text{mg}$ białka (Rys.20A), natomiast w warunkach przewlekłego zatrucia ołowiem odpowiada następującym wartościom: $K_M = 2,15 \text{ mM}$, $V_{\max} = 11,2 \mu\text{mol} / \text{mg}$ białka (Rys.20B). W przypadku inhibicji kompetycyjnej wartość V_{\max} nie zmieniałaby się, zwiększeniu ulegałaby jedynie wartość K_M . Natomiast w klasycznym przypadku inhibicji niekompetycyjnej nie obserwowana byłaby zmiana wartości K_M , tylko zmniejszona byłaby wartość V_{\max} . W przypadku działania ołowiu na CNPazę mamy do czynienia z inhibicją mieszaną, gdyż Pb wpływa zarówno na wiązanie substratu, jak i na liczbę obrotów enzymu.

W kolejnych badaniach konsekwentnie sprawdzano, czy równoległe z obniżeniem specyficznej aktywności CNP-azy zmienia się ilość tego enzymu w grupie zwierząt eksponowanych na ołów.

4.5.2.5. Wpływ ołowiu na zawartość CNP-azy w mielinie

Identyfikacja zawartości CNPazy we frakcji mielinowej prowadzona za pomocą immunodetekcji i analizy densytometrycznej uzyskanych immunoblotów z wykorzystaniem programu komputerowego Gel-Expert 4.0, wykazały zmniejszenie ilości białka CNP u zwierząt eksponowanych na ołów o 20% w porównaniu z kontrolą, (Ryc. 23).



Ryc. 23. Porównanie względnej zawartości białka CNPazy we frakcji mielinowej szczura kontrolnego i poddanego przewlekłej ekspozycji na ołów.

Rycina obrazuje wyniki densytometrii 5 różnych immunoblotów, przedstawionych jako % kontroli.

PODSUMOWANIE części pracy dotyczącej oceny komponenty białkowej mieliny szczurów kontrolnych i zatrutych ołowiem.

1. Wykazano statystycznie znaczne obniżenie ilości białkowych grup –SH w mielinie szczurów zatrutych Pb.
2. Przewlekła ekspozycja na Pb prowadzi do obniżenia zarówno ilości białka jak i aktywności enzymatycznej CNPazy.

5. Dyskusja

Tematem niniejszej pracy była ocena wrażliwości mieliny ośrodkowego układu nerwowego szczura z wykształconą barierą krew/mózg na przewlekłe zatrucie niskimi stężeniami ołowiu imitujące skażenie środowiska, jak również próba poszukiwania biofizycznych, biochemicznych mechanizmów, które mogłyby być odpowiedzialne za zaburzenia w budowie mieliny.

Kierując się wyborem najmniej inwazyjnej metody zastosowano ekspozycję polegającą na podawaniu szczurom do picia wody z dodatkiem octanu ołowiu. Do doświadczeń użyto octan ołowiu, który w przeciwieństwie do innych związków ołowiu charakteryzuje się dobrą rozpuszczalnością w wodzie. Dzienna dawka ołowiu jaką otrzymywały zwierzęta mieściła się w granicach stężeń uważanych za niskie (52, 62, 147).

Zastosowany model zatrucia jest zgodny z opisywanym w literaturze modelem badań nad toksycznością niskich dawek ołowiu i dobrze imituje **narażenie środowiskowe** na ten metal (52, 62, 129).

Ze względu na wysokie ryzyko jakie niesie toksyczne działanie ołowiu na dzieci uwaga badaczy skupiała się głównie na młodych organizmach. Większość badań dotyczących wpływu ołowiu na mielinę o.u.n. przeprowadzano na noworodkach szczurzych. Zwierzętom podawano ołów w bardzo wysokich stężeniach, co powodowało znaczny deficyt komponentów mieliny, zarówno we frakcji białkowej jak i lipidowej.

Mielinogeneza przebiega w dokładnie zdefiniowanym okresie rozwoju osobniczego organizmu i według ściśle określonego programu. Proces mielinizacji zaczyna się w życiu płodowym i kończy w różnym okresie po narodzinach w zależności od gatunku. Szczyt procesu mielinizacji o.u.n. u zdrowego szczura przypada na 18 dzień życia (7). Dlatego też u szczurów poddanych bardzo wczesnej (tj. prenatalnej lub wczesno postnatalnej) ekspozycji na ołów obserwowano duże zmiany w osłonce mielinowej o.u.n..

Szczególne wrażliwość młodych organizmów na toksyczne działanie ołowiu wiązana jest z niedojrzałością bariery krew/mózg. Jedną z funkcji bariery krew/mózg jest zabezpieczenie mózgu przed wnikaniem z krwi substancji toksycznych. U organizmów młodych kiedy bariera krew/mózg nie spełnia swojej funkcji ochronnej obserwuje się wzrost stężenia ołowiu w mózgowych naczyniach krwionośnych jak i w tkance mózgowej (86, 104, 105, 147). Przez długi czas uważano, że dobrze wykształcona bariera krew/mózg jest wystarczającą ochroną dla mózgu przed wnikaniem ołowiu.

Badania z końca XX wieku wykazały, że ołów może pokonywać również dobrze wykształconą barierę krew – mózg. Udowodniono, że kapilary mózgowe są miejscem szczególnie wysokiej kumulacji ołowiu w porównaniu z innymi strukturami mózgowymi, nawet w warunkach narażenia na niskie stężenia ołowiu. Ołów może przedostawać się do mózgu szczurów dorosłych na skutek zwiększonego transportu pinocytarnego przez cytoplazmę komórek endotelialnych lub też otwierania się ścisłych połączeń interendotelialnych (104, 105, 140, 142). W 1993 roku Deane i Bradburg (17) opracowali model transportu Pb przez endotelium mikronaczyń mózgowych u dorosłych szczurów, którego mechanizm polega na biernej dyfuzji kompleksu jonowego $Pb(OH)^+$ zgodnie z gradientem elektrochemicznym. Przechodzenie tego kompleksu w kierunku przeciwnym jest ograniczane przez Ca-ATPazę. Hipotezę, że ołów przedostaje się przez dwuwarstwą lipidową na zasadzie biernej dyfuzji jonów $Pb(OH)^+$ potwierdziły doświadczenia *in vitro* przeprowadzone na liposomach otrzymanych z lipidów mieliny (38).

W niniejszej pracy po raz pierwszy opisano przewlekłe działanie niskich stężeń ołowiu na mielinę o.u.n. u organizmów z wykształconą barierą krew/mózg. Roztwór ołowiu zaczęto podawać szczurom trzytygodniowym, które jak wiadomo z literatury mają w pełni wykształconą barierę krew/mózg (37, 136).

Podstawową funkcją o.u.n. jak wiadomo jest generowanie impulsów i ich przewodzenie. Nasze wcześniejsze badania dotyczące przewlekłej toksyczności niskimi stężeniami Pb wykazały, że funkcje te mogą być zaburzone poprzez zmiany w procesach energetycznych zakończeń nerwowych (111, 121, 124). W niniejszej pracy zwrócono uwagę na zmiany w strukturze mieliny wywołane ołowiem, które niewątpliwie mogą powodować zaburzenia w przewodzeniu impulsów.

Obserwowane przez nas zaburzenia prawidłowej struktury otoczki mielinowej wyrażające się obecnością fragmentów błon o rozluźnionej strukturze blaszek mielinowych, z powiększeniem i rozcięciem przestrzeni międzylamelarnych, lub też zatartym obrazem poszczególnych blaszek, wskazują na destrukcyjne działanie ołowiu. W naszych badaniach zaobserwowaliśmy bardzo duży wzrost stężenia Pb we frakcji mielinowej, większy niż w homogenacie mózgowym czy frakcji synaptosomalnej. Wydaje się zatem, że w mózgu właśnie mielina jest najbardziej narażona na „atak” ołowiu. Dlatego też obserwowane zaburzenia w strukturze mieliny są tak liczne. Aż w 90% obrazów z mikroskopu elektronowego skrawków otrzymanych ze zwierząt poddanych przewlekłej ekspozycji na ołów wykazane zostały zmiany. Mikroskopowo-elektronowe obserwacje komórek oligodendrocytarnych, które jak wiadomo są odpowiedzialne za wytwarzanie mieliny w o.u.n., również wykazały zmiany struktury w warunkach ekspozycji na Pb. Wyniki te są zgodne z doświadczeniami Denga i Poretza (2001), prowadzonymi na hodowlach komórkowych, gdzie wykazano również wysoką wrażliwość oligodendrocytów, a zwłaszcza prooligodendrocytów na toksyczne działanie ołowiu (34, 35). Badania te potwierdzają hipotezę o szczególnej wrażliwości bardzo młodych organizmów na toksyczne działanie ołowiu.

Fizykochemiczne badania prowadzone w niniejszej pracy wykazały, że obserwowane zaburzenia w strukturze otoczki mielinowej mają bezpośredni związek ze zwiększeniem płynności błon mieliny w warunkach toksyczności ołowiowej.

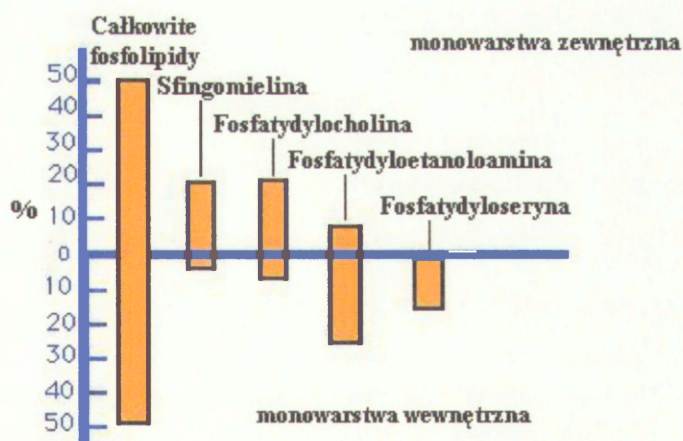
Jak już zaznaczono we wstępie płynność błon biologicznych zależy od wielu czynników takich jak: stosunek białek i lipidów w błonie, stosunek nasyconych i nienasyconych kwasów tłuszczowych, poziom poszczególnych fosfolipidów, zawartość cholesterolu, glikolipidów, poziom związanych z błoną jonów Ca^{2+} i Mg^{2+} . Znane są prace o wpływie ołowiu na skład błon komórkowych wątroby i erytrocytów (41, 42), podkreślające zwiększenie stężenia wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, głównie kwasu arachidonowego (72) Dotychczas jednak brak było danych dotyczących przewlekłego działania ołowiu na skład chemiczny i płynność błon mieliny o.u.n. u zwierząt z wykształconą barierą krew-mózg.

Jak wykazano w niniejszej pracy bezpośrednią przyczyną obserwowanych zmian morfologicznych osłonki mielinowej szczurów poddanych przewlekłej ekspozycji na ołów jest zmiana płynności błon mielinowych (32), co mogło sugerować obniżenie poziomu cholesterolu obecnego w błonie. Związek ten jak wiadomo w swojej budowie cząsteczkowej ma sztywne pierścienie sterydowe, przez co spełnia rolę regulującą i stabilizującą płynność frakcji lipidowej błon komórkowych. Mielina charakteryzuje się dużą zawartością tego sterydu sięgającą 30% całkowitych lipidów (93). Wbrew oczekiwaniom w stosowanym modelu przewlekłego narażenia na ołów nie zaobserwowano różnic w ilości cholesterolu w porównaniu z warunkami kontrolnymi.

Poszukując innych subkomórkowych mechanizmów odpowiedzialnych za zwiększoną płynność błon mieliny o.u.n. u szczurów eksponowanych na ołów skupiono uwagę na najliczniejszym ilościowo składniku lipidów błon mielinowych – fosfolipidach.

W technice elektronowego rezonansu paramagnetycznego parametr uporządkowania mierzy sprężystość lipidowego znacznika wprowadzonego do dwuwarstwy lipidowej. Długa

oś znacznika umiejscowiona jest prostopadle do płaszczyzny powierzchni błony. Parametr uporządkowania jest pomiarem amplitudy ruchu molekularnej długiej osi wokół średniej orientacji łańcucha kwasu tłuszczowego w dwuwarstwie lipidowej (65). Gdy ruch znacznika nie występuje maksymalna wartość parametru uporządkowania wynosi 1, gdy ruch znacznika jest izotropowy osiągnięta jest minimalna wartość wynosząca 0. Płynność frakcji lipidowych błon bezpośrednio zależy od ruchliwości samych cząsteczek fosfolipidów, jak również od ich łańcuchów węglowodorowych. Ruchy łańcuchów kwasów tłuszczowych zależą od ich długości oraz ilości wiązań nienasyconych. Fosfolipidy cholinowe (fosfatydylocholina PC i sfingomielina SM) mają mniej nasycone łańcuchy kwasów tłuszczowych w porównaniu z fosfolipidami aminowymi (fosfatydyloetanolamina PE i fosfatydyloseryna PS) (154). Odpowiednie rozmieszczenie czterech głównych fosfolipidów zapewnia pełną asymetrię błony, a zaburzenia w poziomie poszczególnych grup mogą wpływać na zmiany płynności błony. Znane rozmieszczenie fosfolipidów w błonach erycyty ludzkiego (schemat 7) sugeruje położenie PE i PS w monowarstwie wewnętrznej od strony cytoplazmy.



Schemat 7. Asymetryczne rozmieszczenie fosfolipidów w płaszczyźnie poprzecznej błony erycyty ludzkiego wg. Natural Toxins Research Center at Texas A&M University – Kingsville (<http://ntri.tamuk.edu/cell/membranes.html>)

W niniejszej pracy w przewlekłej ekspozycji na ołów zaobserwowano statystycznie znamienne wzrost poziomu PE w mielinie mózgu szczura. Przy tym samym poziomie

istotności wykazano wzrost proporcji PE/PC u szczurów zatrutych przewlekle niskimi dawkami łożowiu. Zwiększenie zawartości PE w stosunku do PC może sugerować utratę asymetrii błon, powstawanie domen lipidowych połączone z tworzeniem mostków siarczkowych (-S-S-) i ułatwione tworzenie struktur heksagonalnych (charakterystycznych dla PE) (29, 53, 153). W konsekwencji może to prowadzić do destabilizacji dwuwarstwy i zmian oddziaływań lipid/białko, gdy równocześnie obniżony jest stosunek -SH/-S-S-, co potwierdzają nasze badania wskazujące na zmniejszenie ilości białkowych grup -SH u szczurów zatrutych łożowiem. Zagadnienie to będzie szerzej omawiane w dalszej części dyskusji.

Poza tym łożów wiąże się głównie z ligandami zawierającymi grupy aminowe, co może prowadzić do zmian konfiguracyjnych w cząsteczce fosfolipidu, a to z kolei może zaburzać strukturę błony (48). Powyższa koncepcja mechanizmu zmian w płynności błon mielinowej w toksyczności łożowiovej u dorosłych szczurów oparta na obserwowanych w niniejszej pracy zmianach PE/PC oraz spadku białkowych grup -SH jest bardzo prawdopodobna, ale nie jedyna. Poza fosfolipidami i sterolami (cholesterol) w skład komponenty lipidowej błony wchodzi również glikolipidy.

Mimo, że cel niniejszej pracy nie obejmował badań nad tą subfrakcją lipidową jednakże nie sposób pominąć w dyskusji możliwej roli glikolipidów w toksyczności łożowiovej. Grupy cukrowe w glikolipidach umiejscowione są na zewnątrz błony dośrodkowo i w ten sposób są bardziej narażone na wpływ czynników zewnętrznych. W ostatnich latach pojawiło się kilka prac związanych ze zmianami komponenty glikolipidowej błon jednakże prace nie dotyczą przewlekłego zatrucia małymi dawkami łożowiu zwierząt dorosłych. Badania Denga W. i Poretza R. D. (2001) (35), skupiają się na frakcji galaktolipidów i szlaków enzymatycznych dotyczących galaktolipidów w trakcie rozwoju mózgowia u szczura. W modelu doświadczalnym badacze zastosowali model ekspozycji dużymi dawkami łożowiu

(500 lub 2000 ppm w wodzie do picia). Ekspozycję rozpoczynano już w życiu płodowym, kiedy bariera krew/mózg jest niewykształcona. Brak danych dotyczących przewlekłego działania ołowiu na poziom glikolipidów u organizmów z wykształconą barierą krew/mózg jest dla nas przyszłościowym wyzwaniem.

Doświadczenia z zastosowaniem modelu ekspozycji na ołów, wg Denga i Poretza (35, 36) wykazały obniżenie poziomu galaktolipidów w podobnym stopniu jak fosfodiesterazy 2'3'-cyklicznych nukleotydów (CNP-azy). Stwierdzono również większy spadek aktywności enzymów metabolicznych dla galaktolipidów w porównaniu z redukcją CNPazy i galaktolipidów. Podobne wyniki uzyskano w badaniach na hodowlach komórkowych oligodendrocytów, gdzie również wykazano większą wrażliwość na ołów prooligodendrocytów niż dojrzałych oligodendrocytów (34, 35, 36). Chroniczna ekspozycja na ołów może wpływać niekorzystnie na rozwój mózgowia poprzez hamowanie produkcji mieliny przy wczesnym działaniu ołowiu na progenitory oligodendrocytów, a przede wszystkim na szlak enzymatyczny galaktolipidów w dojrzewających oligodendrocytach. Zaburzenie szlaku enzymatycznego galaktolipidów może być jednym z mechanizmów neurotoksyczności indukowanej przez ołów. Wydaje się więc, że frakcja glikolipidów jest wrażliwa na toksyczne działanie ołowiu zwłaszcza u bardzo młodych organizmów.

Wysoki poziom lipidów w ośrodkowym układzie nerwowym jak również jego duże zapotrzebowanie na tlen sprawiają, że mózg jest wyjątkowo wrażliwy na procesy peroksydacyjne. Dlatego w niniejszej pracy poświęcono sporo uwagi ewentualnej roli ołowiu w indukcji wolnorodnikowego utleniania lipidów w mielinie.

Dotychczasowe dane literaturowe wskazywały, że ołów powoduje wzmożenie żelazozależnych procesów peroksydacyjnych w erytrocytach, surowicy i wątrobie szczura (108, 114, 130). Badania z użyciem synaptosomów wykazały, że w warunkach peroksydacji indukowanej jonami Fe^{3+} występują zmiany w transporcie neuroprzebieżników: GABA i

dopaminy oraz histaminy i jej prekursora histydyny (121, 123). Nie wykazano jednak, aby ołów w warunkach chronicznej ekspozycji, miał zdolność indukowania procesu peroksydacji samoistnej w synaptosomach, homogenacie mózgowym i homogenacie wątroby (30, 108, 131). Również nie wykazano wpływu ołowiu na żelazozależną peroksydację w preparatach mózgowych (30). W niniejszej pracy, podobnie jak w pracach wymienionych wyżej, ołów nie indukował procesu peroksydacji samoistnej we frakcji mielinowej. Również nie zaobserwowano wzmożenia peroksydacji żelazozależnej we frakcji mielinowej u szczurów eksponowanych na ołów. W przeciwieństwie do frakcji mózgowych, w homogenatach wątroby otrzymanych ze zwierząt eksponowanych na ołów zaobserwowano znaczny wzrost żelazozależnej peroksydacji – potwierdzający wyniki literaturowe. Zatem brak wpływu ołowiu na procesy peroksydacyjne stanowi element wyróżniający o.u.n. spośród innych tkanek. Możliwe jest istnienie specyficznych dla mózgu mechanizmów obronnych znoszących niekorzystne działanie ołowiu. Niektórzy badacze sugerują, że w warunkach chronicznego zatrucia ołowiem może następować wzmożona synteza glutationu, który bierze udział w zmiataniu aktywnych rodników tlenowych (73, 74).

Podsumowując, na podstawie uzyskanych wyników nie można stwierdzić, aby za zmiany obserwowane w budowie mieliny i zmiany jej płynności wywołane przewlekłą toksycznością ołowiową były odpowiedzialne procesy peroksydacyjne.

Dyskutując wcześniej rozkład fosfolipidów we frakcji mielinowej zwierząt kontrolnych i zatrutych ołowiem zwrócono szczególną uwagę na wzrost poziomu PE przy jednoczesnym braku zmian w poziomie PC, co dając wzrost stosunku PE/PC może bezpośrednio wpływać na płynność mieliny.

Z drugiej strony wiadomo, że zmiany w ilości fosfolipidów połączone ze zmianami w ilości białkowych grup –SH mogą sugerować utratę asymetrii błony i tworzenie mostków siarczkowych, wpływając w ten sposób na płynność błon (29, 53, 153). Grupy sulfhydrylowe

(–SH) obecne są w cząsteczce endogennego aminokwasu - cysteiny, który występuje niemal we wszystkich białkach. Reszta cysteiny wchodzi w skład cząsteczki glutationu - najbardziej rozpowszechnionego tiolu w komórkach ssaków. Grupy –SH jak wiadomo odgrywają zasadniczą rolę w zachowaniu budowy i prawidłowego metabolizmu komórki, stabilizują wewnętrzną strukturę białek, uczestniczą w reakcjach utleniania i redukcji. Ogólna hipoteza, powstała z obserwacji *in vitro*, dotycząca toksyczności metali ciężkich (do których należy ołów) wskazuje na ich interakcje z grupami –SH białek (31). Warunkiem wiązania Pb z białkami jest obecność sąsiadujących ze sobą dwóch grup tiolowych, co umożliwia powstanie wiązania typu: -S-Pb-S- (48).

Zaobserwowane w niniejszej pracy statystycznie znamienne zmniejszenie ilości białkowych grup –SH w mielinie szczurów przewlekle eksponowanych na ołów, stanowi niewątpliwie jeden z mechanizmów toksyczności ołowiu w o.u.n..

Częściowe zablokowanie grup –SH białek mieliny przez ołów może w połączeniu ze zmianami w poziomie fosfatydyloetanolaminy powodować utratę asymetrii błony zmieniając jej płynność. Jednak nie jest to jedyny mechanizm prowadzący do destabilizacji błon mieliny w wyniku zmniejszenia ilości grup –SH. Inny, równoległe działający, może polegać na zmniejszeniu ilości grup –SH w białkach konkretnych enzymów czy receptorów, co może prowadzić do zmniejszenia ich aktywności czy pojemności. Jednym z takich enzymów uznanym za marker mieliny, jest CNPaza.

CNPaza jest białkiem, które ulega ekspresji w pierwszych dniach życia. Obniżenie aktywności i ilości białka CNPazy obserwuje się w wielu chorobach dysmielinizacyjnych, w których zaburzony jest proces tworzenia mieliny, jak np. w chorobie Palizeusa-Marzbachera (143, 144). Uważa się, że białko to najprawdopodobniej bierze udział w regulacji syntezy i transportu składników mielinowych (18). Zamieszczone w niniejszej pracy wyniki badań przeprowadzonych na szczurach kontrolnych i przewlekle eksponowanych na ołów wskazują

na wyraźne obniżenie zarówno aktywności enzymatycznej CNPazy, jak i ilości tego białka u zwierząt poddanych działaniu Pb.

Wpływ ołowiu na aktywność i ilość CNPazy może stanowić kolejny mechanizm toksyczności ołowiu w o.u.n.. W warunkach przewlekłej toksyczności niskimi stężeniami ołowiu u szczurów z dojrzałą barierą krew/mózg nie stwierdzono zmian w całkowitej zawartości białek we frakcji mielinowej jak również nie zanotowano zmian w składzie poszczególnych białek mieliny oznaczonych techniką elektroforezy. Niemniej jednak ekspozycja taka nie pozostaje bez wpływu na frakcję mielinową. Zmiany w poziomie PE i CNPazy oraz zmiany w poziomie białkowych grup –SH powodują zaburzenia w prawidłowym funkcjonowaniu osłonki mielinowej poprzez zwiększenie płynności, co w konsekwencji prowadzi do zmian morfologicznych mieliny o.u.n..

Więcej subtelnych zmian, głównie konformacyjnych poszczególnych składników mieliny, może być ujawnionych w przyszłości dzięki zastosowaniu coraz bardziej nowoczesnych, precyzyjnych technik i mogą być ukazane jeszcze inne mechanizmy zaburzeń struktury mieliny pod wpływem ołowiu.

Z danych uzyskanych w niniejszej pracy wynika, że narażenie osobników z wykształconą barierą krew/mózg na przewlekłe działanie ołowiu powoduje zmiany morfologiczne mieliny o.u.n., wyrażające się rozwarstwieniem ściśle upakowanych błon mieliny. Szereg chorób demielinizacyjnych charakteryzuje się podobnymi obrazami morfologicznymi. Niektórzy badacze (157) sugerują potencjalną rolę Pb w patogenezie chorób układu nerwowego takich jak stwardnienie rozsiane czy choroba Alzheimera. Swoją hipotezę opierają na możliwości udziału zanieczyszczonego środowiska w tworzeniu autoprzeciwciał przeciwko białkom układu nerwowego. Potencjalna rola ołowiu wyrażałaby się w modyfikowaniu białek, w następstwie czego produkowane byłyby przeciwciała przeciwko strukturom nerwowym, co z kolei mogłoby powodować degenerację systemu

nerwowego. Według tej hipotezy ołów pogarsza neurologiczne objawy choroby poprzez wzmocnienie immunogenności przeciwko białkom takim jak: MBP i GFAP (157). Zwierzęta traktowane białkami MBP i GFAP modyfikowanymi przez Pb, wykazywały zwiększoną ilość przeciwciał przeciwko MBP i GFAP oraz zwiększoną zawartość interleukiny (IL-6). Nie wszyscy badacze zgadzają się z taką hipotezą, ponieważ wyniki doświadczeń *in vitro* wskazywały na brak wiązania ołowiu z jednym z głównych białek mieliny jakim jest MBP (11).

Wiadomo, że ołów działa zarówno na układ nerwowy jak i układ immunologiczny organizmów (55, 87, 88, 151). U pracowników zawodowo narażonych na toksyczne działanie ołowiu stwierdzono obniżenie poziomu limfocytów T w krwi obwodowej jak również obniżenie przeciwciał odpornościowych IgG i IgM (151). Badając pracowników zawodowo narażonych na ołów wykazano również wpływ na poziom γ -interferonu (88). Określając wpływ środowiskowego działania ołowiu na immunoglobuliny w surowicy u dzieci przedszkolnych, stwierdzono wzrost poziomu IgE, oraz zaobserwowano większą wrażliwość dziewczynek na toksyczne działanie ołowiu (141). IgE jest to klasa immunoglobulin, w której mieszczą się tzw. reaginy czyli przeciwciała czynne w alergii. Oprócz IgE, za wskaźnik rozwoju alergii uważa się również obniżenie interferonu γ [INF- γ]. W badaniach eksperymentalnych w modelu bardzo wczesnej ekspozycji na ołów (w życiu płodowym), wykazano zarówno wzrost poziomu IgE jak również spadek poziomu interferonu γ (87).

Zagadnienie ewentualnej roli ołowiu w etiologii chorób autoimmunologicznych układu nerwowego wymaga szczegółowych badań obejmujących zarówno układ nerwowy jak i układ immunologiczny.

Ołów raczej nie jest kojarzony z patogenezą tych chorób, jednak należy pamiętać, że zatrucie tym pierwiastkiem może „naśladować” wiele jednostek chorobowych, powodując wystąpienie podobnych objawów. W 2000 roku został opisany przypadek pacjenta ze

stwardnieniem rozsianym, u którego objawy choroby nasiliły się pod wpływem zatrucia ołowiem (46). Jak wiadomo jony tego metalu wykazują zdolność gromadzenia się w organizmie przez całe życie, toteż narażenie na bardzo niskie stężenia Pb przez dłuższy okres czasu może prowadzić nawet do ostrych zatruc.

Ołów jest nadal groźną trucizną szeroko rozpowszechnioną w środowisku człowieka, działającą szkodliwie na wszystkie układy i narządy organizmów żywych. Wydaje się, że badania nad mechanizmami działania ołowiu w układach nerwowym i immunologicznym mogą ujawnić nowe mechanizmy neurotoksyczności ołowiowej w autoimmunologicznych chorobach człowieka.

6. WNIOSKI

1. W warunkach przewlekłego zatrucia ołowiem (imitującego skażenie środowiska) u dojrzałych szczurów z wykształconą barierą krew/mózg obserwuje się gromadzenie Pb w mielinie o.u.n. oraz powstawanie zmian w obrazie morfologicznym osłonek mielinowych i oligodendrocytów odpowiedzialnych za tworzenie tych osłonek.
2. Bezpośrednią przyczyną obserwowanych zmian w budowie mieliny w przewlekłym zatruciu ołowiem jest wzrost płynności błon otoczek mielinowych na co wskazują: obniżenie parametru uporządkowania i wartości współczynnika anizotropii fluorescencji.
3. Mechanizmy przewlekłego toksycznego działania ołowiu na mielinę u dojrzałych szczurów udokumentowane w niniejszej pracy polegają na:
 - blokowaniu przez ołów białkowych grup –SH mieliny i tworzeniu wiązań typu S-Pb-S, co w połączeniu ze wzrostem poziomu fosfatydyloetanolaminy i wzrostem stosunku PE/PC prowadzi do zaburzeń płynności błon, a w konsekwencji zmiany ich struktury,
 - obniżeniu ekspresji oraz aktywności specyficznego dla mieliny enzymu CNPazy, co może wpływać na jego funkcję prawdopodobnie polegającą na regulacji syntezy i transportu składników mieliny.
4. Wbrew oczekiwaniom procesy peroksydacyjne i cholesterol nie reagują na warunki przewlekłego działania ołowiu, nie są więc odpowiedzialne za obserwowane zmiany morfologiczne i fizykochemiczne w mielinie o.u.n..

7. STRESZCZENIE

Ołów (Pb) jest jednym z najbardziej szkodliwych pierwiastków występujących w przyrodzie i działających toksycznie na organizmy żywe. Jego obecność w organach i tkankach uważana jest za przejaw zanieczyszczenia środowiska. Globalną antropogenną emisję ołowiu do atmosfery szacuje się obecnie na 4×10^5 ton rocznie i przekracza ona stukrotnie emisję naturalną związaną z wietrzeniem skał i erupcjami wulkanicznymi.

Obserwacje kliniczne i dane patofizjologiczne dostarczają dowodów na ekspansywność toksyczną ołowiu w organizmie. Uszkadza on wątrobę, nerki, kości, erytrocyty, ale przede wszystkim na jego toksyczne działanie narażony jest ośrodkowy układ nerwowy, szczególnie u płodów i organizmów młodych.

Przewlekłe zatrucie niskimi dawkami Pb jest trudne do zdiagnozowania i stanowi poważny problem zdrowotny. Najnowsze badania dotyczące bezpiecznego dla zdrowia progu poziomu Pb we krwi dowodzą szkodliwości ołowiu nawet przy poziomie niższym niż $10 \mu\text{g}/\text{dl}$. Mimo wielu informacji klinicznych i wyników eksperymentalnych dotyczących wpływu ołowiu na metabolizm i funkcje o.u.n., do momentu rozpoczęcia niniejszej pracy, nie było w literaturze danych przemawiających za udziałem przewlekłej toksyczności ołowiowej w powstawaniu zaburzeń w strukturze i metabolizmie mieliny ośrodkowego układu nerwowego.

Obecność ołowiu w otaczającym nas środowisku, przy jednoczesnym braku danych dotyczących jego wpływu na mielinę o.u.n. organizmów z wykształconą barierą krew/mózg w czasie długotrwałej ekspozycji uzasadniły podjęcie kompleksowych badań na modelu zwierzęcym, odpowiadającym warunkom przewlekłego zatrucia Pb.

Zastosowany w pracy model polegał na podawaniu szczurom do picia wody z octanem ołowiowym ($200 \text{ mg}/\text{L}$) począwszy od 21 dnia życia szczura (a więc w momencie, kiedy bariera krew/mózg jest w pełni wykształcona) przez okres 3 miesięcy. Większość badaczy

uznaje stężenie ołowiu we krwi za podstawowy biomarker narażenia na toksyczne działanie tego pierwiastka. W badaniach niniejszej pracy poziom ołowiu we krwi zwierząt eksponowanych na ołów był ok. 15 razy większy w porównaniu ze zwierzętami kontrolnymi. Również we frakcji mielinowej zaobserwowano znaczny wzrost stężenia ołowiu w grupie zwierząt zatrutych Pb w stosunku do grupy zwierząt kontrolnych. Stężenie ołowiu we wszystkich badanych tkankach u szczurów poddanych ekspozycji na ołów było większe w porównaniu z wartościami uzyskanymi dla zwierząt kontrolnych, a największą kumulację zaobserwowano w kościach, co jest charakterystyczne dla przewlekłej ekspozycji na ołów.

Obserwacje mikroskopowo-elektronowe skrawków z mózgów szczurów poddanych przewlekłej ekspozycji na ołów wykazały zmiany morfologiczne. Prawidłowo zbudowana mielina to wielowarstwowa struktura złożona ze ściśle do siebie przylegających błon. Na elektronogramach mieliny otrzymanych ze zwierząt eksponowanych przewlekłe na ołów zaobserwowano odcinki o rozdętych przestrzeniach międzylamelarnych z zatartym obrazem blaszek lub rozluźnieniem ich ściślej struktury. Zaburzenia w strukturze osłonki mielinowej dotyczyły wielu włókien nerwowych. Zaobserwowano również zmiany w komórkach odpowiedzialnych za tworzenie mieliny w ośrodkowym układzie nerwowym - oligodendrocytach – gdzie zanotowano rozproszenie chromatyny w jądrze komórkowym oraz zmiany w strukturze aparatu Golgiego i mitochondriów.

Wraz z wystąpieniem zaburzeń morfologicznych zmieniała się płynność błon mieliny, którą określono techniką EPR i metodą spektrofluorymetryczną. U zwierząt zatrutych ołowiem zaobserwowano obniżenie parametru uporządkowania dla użytego w badaniu znacznika spinowego – estru metylowego kwasu 5' doksylostearynowego, jak również wykazano zmniejszenie współczynnika anizotropii fluorescencji dla znacznika fluorescencji jakim był 1,6 difenylheksa-1,3,5-trien. Obniżona wartość parametru uporządkowania, jak i

zmniejszenie współczynnika anizotropii fluorescencji dowodzą, że u zwierząt chronicznie ekspozowanych na ołów wzrasta płynność błon mielinowych.

Płynność błon w dużej mierze zależy od komponenty lipidowej, a mianowicie od proporcji nasyconych i nienasyconych kwasów tłuszczowych, zawartości fosfolipidów, cholesterolu, glikolipidów czy też proporcji białka i lipidów. Poszukując mechanizmów, które mogłyby być odpowiedzialne za zwiększenie płynności błon mielinowych w zatruciu Pb zbadano między innymi procesy wolnorodnikowego utleniania lipidów. Poziom peroksydacji lipidów określono badając ilość aldehydu malonylowego (MDA). U zwierząt poddanych ekspozycji na ołów nie zaobserwowano zmian w poziomie peroksydacji lipidów w porównaniu z kontrolą. Sam ołów nie wzmagił procesów wolnorodnikowego utleniania. Również poziom peroksydacji żelazozależnej w mielinie nie zmieniał się pod wpływem ołowiu, w przeciwieństwie do wątroby, gdzie zaobserwowano ok. 50% wzrost ilości MDA.

W dalszym etapie pracy zbadano wpływ ołowiu na poziom cholesterolu i fosfolipidów. Pod wpływem Pb poziom cholesterolu nie ulegał zmianie. Różnice w całkowitej zawartości fosfolipidów w mielinie otrzymanej ze zwierząt poddanych ekspozycji na ołów były statystycznie nieznamienne, jak również nie stwierdzono różnic w stężeniu fosfatydylocholiny, fosfatydyloinozytolu, sfingomieliny, fosfatydyloseryny. Zaobserwowano natomiast statystycznie znamienne wzrost poziomu fosfatydyloetanolaminy u zwierząt poddanych przewlekłej ekspozycji na ołów. Przy tym samym poziomie istotności wykazano zwiększenie proporcji fosfatydyloetanolaminy / fosfatydylocholiny.

Wraz ze wzrostem poziomu PE w mielinie zwierząt poddanych przewlekłej ekspozycji na ołów zaobserwowano statystycznie znamienne obniżenie ilości białkowych grup –SH. Zwiększenie poziomu fosfatydyloetanolaminy oraz stosunku PE/PC przy jednoczesnym obniżeniu poziomu grup –SH mogło spowodować zaburzenia w asymetrii błon, powstawanie

domen lipidowych, połączone z tworzeniem mostków siarczkowych, co w konsekwencji mogło doprowadzić do destabilizacji dwuwarstwy i zmian oddziaływań lipid – białko.

Badając komponentę białkową mieliny u zwierząt przewlekle eksponowanych na ołów nie odnotowano zmiany w całkowitej zawartości białka w przeliczeniu na gram mózgu w porównaniu z kontrolą. Opracowanie densytometryczne żeli poliakrylamidowych po rozdziale elektroforetycznym białek mielinowych również nie wykazało statystycznie znamiennych różnic.

Zmniejszenie ilości białkowych grup –SH mogło wywoływać zmiany w aktywności pewnych enzymów, zbadano zatem wpływ ołowiu na aktywność fosfodiesterazy 2'3' cyklicznych nukleotydów (CNP-azy), która jest specyficznym białkiem mieliny, uznanym za jej marker i która prawdopodobnie pełni rolę w regulacji syntezy i wewnątrzkomórkowego transportu składników mielinowych. W warunkach przewlekłego zatrucia ołowiem wykazano spadek aktywności enzymatycznej CNPazy w mielinie, jak również, metodą immunodetekcji, wykazano 20% zmniejszenie ilości tego białka.

Wyniki badań zamieszczone w niniejszej pracy wykazały, że przewlekła ekspozycja na ołów, której poddawano szczury z wykształconą barierą krew/mózg, prowadzi do zmian morfologicznych i metabolicznych w mielinie ośrodkowego układu nerwowego szczura, które mogą zaburzać jej funkcje. Bezpośrednią przyczyną zmian morfologicznych była zwiększona płynność błon mielinowych. Obserwowane uszkodzenia mieliny ośrodkowego układu nerwowego mogły być wynikiem zwiększenia ilości PE, a co za tym idzie zmienionej proporcji PE/PC, zmniejszeniem poziomu białkowych grup –SH, jak również zmniejszeniem ilości i aktywności enzymatycznej CNPazy.

8. PIŚMIENNICTWO

1. Al-Modhefer A.J., Bradbury M.W., Simons T.J. (1991) Observations on the chemical nature of lead in human blood serum. *Clin. Sci.*, 81: 823-829.
2. Andrzejak R., Smolik R. (1996) Współczesne problemy ekspozycji na ołów ze szczególnym uwzględnieniem sytuacji w Polsce. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 50: 581-595.
3. Asakawa T., Matsushita S. (1980) Coloring conditions of thiobarbituric acid test for detecting lipid hydroperoxides. *Lipids*, 15: 137-140.
4. Barry P.S. (1975) A comparison of concentrations of lead in human tissues. *Br. J. Ind. Med.*, 32: 119-139.
5. Bartosz G., Szabo G., Szollosi J., Szollosi J., Damjanovich S. (1981) Aging of the erythrocyte. IX Fluorescence studies on changes in membrane properties. *Mech. Ageing Dev.*, 16: 265-274.
6. Bartsch U., Kirchhoff F., Schachaner M. (1989) Immunohistological localization of the adhesion molecules L1, N-CAM and MAG in the developing and adult optic nerve of mice. *J. Comp. Neurol.*, 284: 451-462.
7. Baumann N., Pham-Dinh D. (2001) Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol. Rev.*, 81: 871-927.
8. Bellinger D., Leviton A., Allred E., Rabinowitz M. (1994) Pre- and postnatal lead exposure and behavior problems in school aged children. *Environ. Res.*, 66: 12-30.
9. Bellinger D.C. (2004) Lead. *Pediatrics*, 113: 1016-1022.
10. Bercovitz K., Laufer D. (1992) Systemic lead absorption in human tooth roots. *Arch Oral Biol.*, 37: 385-7.
11. Berlet H.H., Bischoff H., Weinhardt F. (1994) Divalent metals of myelin and their differential binding by myelin basic protein of bovine central nervous system. *Neurosci Lett.*, 179: 75-78.
12. Bilińska M., Koszewicz M., Brzozowska D., Antonowicz-Juchniewicz J. (2002) Subkliniczne uszkodzenie układu nerwowego u pracowników przewlekłe narażonych na działanie ołowiu. Streszczenie na XVIII Zjazd Polskiego Towarzystwa Neurologicznego.
13. Blight E.G., Dyer W.J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Med. Sci.*, 37: 911-917.

14. Booth R.F., Clark J.B. (1978) A rapid method for the preparation of relatively pure metabolically competent synaptosomes from rat brain. *Biochem J.*, 176: 365-370.
15. Border E.A., Cantrell C., Kilroe-Smith T.A. (1976) The in vitro effect of zinc on the inhibition of human delta-aminolevulinic acid dehydratase by lead. *Br. J. Ind. Med.*, 33: 85-87.
16. Bowman R.E., Wolf R.C. (1962) A rapid and specific ultramicro method for total serum cholesterol. *Clin. Chem.*, 8: 302-309.
17. Bradbury M.W., Deane R. (1993) Permeability of the blood-brain barrier to lead. *Neurotoxicology*, 14: 131-136.
18. Braun P.E., Bambric L.L., Edwards A.M., Bernier L. (1990) 2'3'-Cyclicnucleotide 3'-phosphodiesterase has characteristic of cytoskeletal proteins. A hypothesis for its function. *Ann. N.Y.Acad. Sci.*, 605: 55-65.
19. Braun P.E., Horvath E., Yong V.W., Bernier L. (1990) Identification of GTP-binding proteins in myelin and oligodendrocyte membranes. *J. Neurosci. Res.*, 26: 16-23.
20. Brunner C., Lassmann H., Waehneltd T.V., Matthieu J.M., Lington C. (1989) Differential ultrastructural localization of myelin basic protein, myelin oligodendroglial glycoprotein and 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase in the CNS of adult rats. *J. Neurochem.*, 52: 296-304.
21. Butterfield D.A. (1977) Electron spin resonance investigations of membrane proteins in erythrocytes in muscle diseases. Duchenne and myotonic muscular dystrophy and congenital myotonia. *Biochim. Biophys. Acta*, 470: 1-7.
22. Campagnoni A.T., Macklin W.B. (1988) Cellular and molecular aspects of myelin protein gene expression. *Mol. Neurobiol.*, 2: 41-89.
23. Canfield R.L., Henderson C.R. Jr, Cory-Slechta D.A., Cox C., Jusko T.A., Lanphear B.P. (2003) Intellectual impairment in children with blood lead concentrations below 10microg per deciliter. *N. Engl. J. Med.*, 348: 1517-1526.
24. Cantrell A.C., Kilroe-Smith T.A., Simones H.M., Border E.A. (1977) The effect of zinc and pH on the behavior of δ -aminolevulinic acid dehydrogenase activity in baboons exposed to lead. *British J. Ind. Med.*, 34: 110-113.
25. Chisolm J.J. Jr (1992) BAL, EDTA, DMSA and DMPS in the treatment of lead poisoning in children. *J Toxicol. Clin. Toxicol.*, 30: 493-504.
26. Cooper G.P., Suszkiw J.B., Manalis R.S. (1984) Heavy metals: effects on synaptic transmission. *Neurotoxicology*, 5: 247-266.

27. Cory-Slechta D.A. (1988) Mobilization of lead over the course of DMSA chelation therapy and long term efficacy. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 246: 84-91.
28. Crutcher J.C. (1963) Clinical manifestations and therapy of acute lead intoxication due to the ingestion of illicitly distilled alcohol. *Ann. Intern. Med.*, 59: 707-715.
29. Cullis P.R., de Kruijff B., Hope M.J., Verkirij A.J., Nayer R., Farren S.B., Tilcock C., Madden T.D., Bally M.B. (1983) w: *Membrane Fluidity in Biology, Concepts of Membrane Structure*, ed. Aloia R., New York, Academic Press.
30. Dąbrowska-Bouta B., Strużyńska L., Rafałowska U. (1996) Does lead provoke the peroxidation process in rat brain synaptosomes? *Mol. Chem. Neuropathol.*, 29: 127-139.
31. Dąbrowska-Bouta B., Strużyńska L., Rafałowska U. (1996) Effect of acute and chronic lead exposure on the level of sulfhydryl groups in rat brain. *Acta Neurobiol. Exp.*, 56: 233-236.
32. Dąbrowska-Bouta B., Sulkowski G., Bartosz G., Walski M., Rafałowska U. (1999) Chronic lead intoxication affects the myelin membrane status in the central nervous system of adult rats. *J. Mol. Neurosci.*, 13: 127-139.
33. Deane R., Bradbury M.W. (1990) Transport of lead-203 at the blood-brain barrier during short cerebrovascular perfusion with saline in the rat. *J. Neurochem.*, 54: 905-914.
34. Deng W., Mc Kinnon R.D., Poretz R.D. (2001) Lead exposure delays the differentiation of oligodendroglial progenitors in vitro. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 174: 235-244.
35. Deng W., Poretz R.D. (2001) Lead alters the developmental profile of the galactolipid metabolic enzymes in cultured oligodendrocyte lineage cells. *Neurotoxicology*, 22: 429-437.
36. Deng W., Poretz R.D. (2001) Lead exposure affects of galactolipid metabolic enzymes in the developing rat brain. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 172:98-107.
37. Dermietzel R., Krause D. (1991) Molecular anatomy of blood-brain barrier as defined by immunocytochemistry. *Int. Rev. Cyt.*, 127: 57-109.
38. Diaz R.S., Monreal J. (1995) Protein-independent lead permeation through myelin lipid liposomes. *Mol. Pharmacol.*, 47: 766-71.
39. Domańska-Janik K., Bourne J.M. (1987) Effect of mercury on rabbit myelin CNP-ase in vitro. *Neurotoxicology*, 8: 23-32.

40. Domańska-Janik K., Gajkowska B., de Nechaud B., Bourre J. M. (1988) Myelin composition and activities of CNPase and Na⁺K⁺-ATPase in hypomyelinated "pt" mutant rabbit. *J. Neurochem.*, 50: 122-130.
41. Donaldson W.E., Knowles S.O. (1993) Is lead toxicosis a reflection of altered fatty acid composition of membranes? *Comp. Biochem. Physiol. C.*, 104: 377-379.
42. Donaldson W.E., Leeming T.K. (1984) Dietary lead: effects on hepatic fatty acid composition in chicks. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 73: 119-123.
43. Dutkiewicz T., Kulka E. (1993) Poziomy referencyjne ołowiu u dzieci z czystych rejonów Polski. *Med. Pr.*, 44: 77-84.
44. Dz.U. (2003) nr.1, poz.12 – Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 5 grudnia 2002r.
45. Finkelstein Y., Markowitz M.E., Rosen J.F. (1998) Low-level lead-induced neurotoxicity in children: an update on central nervous system effects. *Brain Res. Brain Res. Rev.*, 27: 168-176.
46. Fisher A.A., Le Couteur D.G. (2000) Lead poisoning from complementary and alternative medicine in multiple sclerosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 69: 687-689.
47. Fowler B.A., Kimmel C.A., Woods J.S., McConnell E.E., Grant L.D. (1980) Chronic low-level lead toxicity in the rat. III. An integrated assessment of long-term toxicity with special reference to the kidney. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 56: 59-77.
48. Goering P.L. (1993) Lead-protein interaction as a basis for lead toxicity. *Neurotoxicology*, 14: 45-60.
49. Goldstein G.W., Asbury A.K., Diamond I. (1974) Pathogenesis of lead encephalopathy: Uptake of lead and reaction of brain capillaries. *Arch. Neurol.*, 31: 382-389.
50. Goyer R.A. (1990) Transplacental transport of lead. *Environ. Health Perspect.*, 89: 101-105.
51. Goyer R.A., Chisolm J.J. (1972) Lead. W: *Metabolic contaminants and human health*. Wyd. D.H.K. Lee, Academic Press, N.Y. and London.
52. Grant L.D., Kimmel C.A., West G.L., Martinez-Vargas Ch.M., Howard J.L. (1980) Chronic low-level lead toxicity in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 56: 42-58.
53. Haest C.W., Deuticke B. (1976) Possible relationship between membrane proteins and phospholipid asymmetry in the human erythrocyte membrane. *Biochim. Biophys. Acta.*, 436: 353-365.

54. Harry G.J., Toews A.D. Krigman M.R., Morell P. (1985) The effect of lead toxicity and milk deprivation on myelination in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 77: 458-464.
55. Hrycek A., Kalina M. (1996) Wpływ ołowiu na granulocyty obojętnochłonne. *Wiad. Lek.*, 49: 103-106.
56. Hubbell W.L., McConnell H.M. (1971) Molecular motion in spin-labeled phospholipids and membranes. *J. Am. Chem. Soc.*, 93: 314-326.
57. Jabłońska L., Walski M., Rafałowska U. (1994) Lead as an inductor of some morphological and functional changes in synaptosomes from rat brain. *Cell Mol. Neurobiol.*, 14: 701-709.
58. Jakubowski M. (1993) Poziomy biologiczne ołowiu u mieszkańców Polski. *Med. Pr.*, 44: 15-34.
59. Juberg D.R., Kleiman C.F., Kwon S.C. (1997) Position paper of the American Council on Science and Health: lead and human health. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 38:162-180.
60. Kehoe R.A. (1976) Pharmacology and toxicology of heavy metals: Lead. *Pharmac. Ther.*, 1: 161-188.
61. Khalil-Manesh F., Gonick H.C., Weiler E., Prins B., Weber M.A., Purdy R., Ren O (1994) Effect of chelation treatment with dimercaptosuccinic acid (DMSA) on lead-related blood pressure changes. *Environ. Res.*, 65: 86-99.
62. Kimmel C.A., Grant L.D., Sloan C.S., Gladen B.C. (1980) Chronic low-level lead toxicity in the rat. I Maternal toxicity and perinatal effects. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 56: 28-41.
63. Kochen J.A., Greener Y. (1975) Lead binding by transferrin. *Pediatr. Res.*, 9:323.
64. Kosnett M.J. (1992) Unanswered questions in metal chelation. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.*, 30: 529-47.
65. Koter M., Grzeleńska E. (1989) Interpretacja widm znaczników spinowych stosowanych w badaniach płynności lipidów błon. *Zagad. Biof. Współcz.*, 14: 103-122.
66. Kozubek A., Sikorski F.A., Szopa J. (1993) Lipidy, liposomy i błony biologiczne. W: *Molekularna organizacja komórki. Skrypt do ćwiczeń. T.II* (Kozubek A., Red.) Wydawnictwo Uniwersytetu Wrocławskiego, Wrocław.
67. Krigman M.R. (1978) Neuropathology of heavy metal intoxication. *Environ. Health Perspect.*, 26: 117-120.

68. Kurihara T., Tsukada Y. (1967) The regional and subcellular distribution of 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphohydrolase in the central nervous system. *J. Neurochem.*, 14: 1167-74.
69. Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
70. Lampert P.W., Schochet S.S. (1968) Demyelination and remyelination in lead neuropathy. *J. Neuropathol. Experimen. Neurol.*, 4: 527-545.
71. Lassmann H, Bruck W, Lucchinetti C. (2001) Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: implications for diagnosis and therapy. *Trends Mol. Med.*, 7: 115-21.
72. Lawton L.J., Donaldson W.E. (1991) Lead-induced tissue fatty acid alterations and lipid peroxidation. *Biol. Trace Elem. Res.*, 28: 83-97.
73. Legare M.E, Barhoumi R., Burghardt R.C., Tiffany-Castiglioni E. (1993) Low-level lead exposure in cultured astroglia: identification of cellular targets with vital fluorescent probes. *Neurotoxicology*, 14: 267-72.
74. Legare M.E., Castiglioni A.J. Jr., Rowles T.K., Calvin J.A., Snyder- Armsted C., Tiffany-Castiglioni E. (1993) Morphological alterations of neurons and astrocytes in guinea pigs exposed to low levels of inorganic lead. *Neurotoxicology*, 14: 77-80.
75. Levi G., Aloisi F., Wilkin G.P. (1987) Differentiation of cerebral biopotential glial precursor into oligodendrocytes in primary culture: developmental profile of surface antigens and mitotic activity. *J. Neurosci. Res.*, 18: 407-417.
76. Levy L.S. (1993) Lead and cardiovascular disease. W: Risk Factors for Cardiovascular Disease in Non-Smokers. Red. D.F. Weetman, D. Wood, Basel Karger, 108-117.
77. Li P.J., Sheng Y.Z., Wang O.Y., Gu L.Y., Wang Y.L. (2000) Transfer of lead via placenta and breast milk in human. *Biomed. Environ. Sci.*, 13: 85-9.
78. Litman B.J., Barenholz Y. (1982) Fluorescent probe: diphenylhexatriene. *Methods Enzymol.*, 81: 678-685.
79. Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275.
80. Lucchinetti C, Bruck W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H. (2000) Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann. Neurol.*, 47: 707-17.
81. Lustberg M., Silbergeld E. (2002) Blood lead levels and mortality. *Arch. Intern. Med.*, 162: 2443-2449.

82. Małecka E., Małecki A., Jarosińska D., Powązka E., Pawlas N., Pawlas K. (2002) Wpływ stężenia ołowiu we krwi na wyniki badania EEG i mapowania EEG u dzieci. Streszczenie na XVIII Zjazd Polskiego Towarzystwa Neurologicznego.
83. Manalis R.S., Cooper G.J. (1973) Letter: Presynaptic i postsynaptic effects of lead at the frog neuromuscular junctions. *Nature*, 243: 354-356.
84. Marcus A.H. (1979) The body burden of lead: comparison of mathematical models for accumulation. *Environ. Res.*, 19: 79-90.
85. Marek K. (1988) Zasady rozpoznawania i profilaktyki lekarskiej ołowicy. *Med. Pr.* 39: 115-122.
86. Michaelson I.A., Sauerhoff M.W. (1974) An improved model of lead-induced brain dysfunction in the suckling rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 28: 88-96.
87. Miller T.E., Golemboski K.A., Ha R.S., Bunn T., Sanders F.S., Dietert R.R. (1998) Developmental exposure to lead causes persistent immunotoxicity in Fisher 344 rats. *Toxicol. Sci.*, 42: 129-135.
88. Mishra K.P., Singh V.K., Rani R., Yadav V.S., Chandran V., Srivastava S.P., Seth P.K. (2003) Effect of lead exposure on the immune response of some occupationally exposed individuals. *Toxicology*, 188: 251-259.
89. Mohaffey K.R., Michaelson J.A. (1980) The interaction between lead and nutrition. W: *Low level lead exposure. The clinical implications of current research.* Wyd. H.L. Needleman, Raven Press, N.Y..
90. Moller L., Kristensen T.S. (1992) Blood lead as a cardiovascular risk factor. *Am. J. Epidemiol.*, 136: 1091-1100.
91. Monton F., Coria F. (1991) Reversible Schwann cell hypertrophy in lead neuropathy. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 17: 231-236.
92. Morell P. (1994) Biochemical and molecular bases of myelinopathy. *Principles of Neurotoxicology*, wyd. L.W. Chang, Marcel Dekker, N.Y.
93. Morell P., Quarles R.H., Norton W.T. (1989) Formation, structure and biochemistry of myelin. W: *Basic Neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects.* 4th Ed., wyd. G.J. Siegel i wsp., Raven Press, Ltd., New York.
94. Morgan W.D., Ryde S.J., Jones S.J., Wyatt R.M., Hainsworth I.R., Cobbold S.S., Evans C.J., Braithwaite R.A. (1990) In vivo measurements of cadmium and lead in occupationally-exposed workers and an urban population. *Biol. Trace Elem. Res.*, 26-27: 407-14.

95. Mossakowski M. J. (1981) Struktura ośrodkowego układu nerwowego. W: Podstawy neuropatologii. red. Mossakowski M.J., Dymecki J., Wender M., PZWL.
96. Mushak P. (1993) New directions in the toxicokinetics of human lead exposure. *Neurotoxicology*, 14: 29-42
97. MZiOS, Departament Inspekcji Sanitarnej (1982) Kryteria zdrowotne środowiska. Tom 3, Ołów, PZWL, Warszawa.
98. NIK (Najwyższa Izba Kontroli) (2002), Departament Środowiska, Rolnictwa i Zagospodarowania Przestrzennego, Warszawa marzec 2002r. Informacja o wynikach kontroli zaopatrzenia w wodę ludności aglomeracji miejskich. DŚRiZP –41002/2001 nr. ewid.: 186/2001/P/01/084/CRS
99. Nilsson U., Attewell R., Christoffersson J.O., Schütz A., Ahlgren L., Skerfving S., Mattsson S. (1991) Kinetics of lead in bone and blood after end of occupational exposure. *Pharmacol. Toxicol.*, 68: 477-484.
100. Nolan C.V., Shaikh (1992) Lead nephrotoxicity and associated disorders: biochemical mechanisms. *Toxicology*, 73: 127-146.
101. Norton W.T. Poduslo S.E. (1973) Myelination in rat brain: method of myelin isolation. *J. Neurochem.*, 21: 749-757.
102. Nowack R., Więcek A., Exner B., Gretz N., Ritz E. (1993) Chronic lead exposure in rats: effect on blood pressure. *Eur. J. Clin. Invest.*, 23: 433-443.
103. Ohnishi A., Schilling K., Brimijoin W.S., Lambert E.H., Fairbanks V.F., Dyck P.J. (1977) Lead neuropathy. 1) Morphometry, nerve conduction, and choline acetyltransferase transport: new finding of endoneurial edema associated with segmental demyelination. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 36: 499-518.
104. Pentschew A. (1965) Morphology and morphogenesis of lead encephalopathy. *Acta Neuropathol.*, 5: 133-160.
105. Pentschew A., Garro F. (1966) Lead encephalo-myelopathy of the suckling rat and its implications on the porphyrinopathic nervous diseases. With special reference to the permeability disorders of the nervous system's capillaries. *Acta Neuropathol.*, 6: 266-278.
106. Pfeiffer S.E., Bansal R., Gard A.L., Warrington A.E. (1990) Regulation of oligodendrocyte progenitors development: antibody-perturbation studies. NATO ASI series, vol. H 43, w: Cellular and Molecular Biology of Myelination., wyd. Jeserich G i wsp., Springer – Verlag Berlin Heidelberg.

107. Pionelli S. (1980) The effects of low level lead exposure on heme metabolism. W: Low level lead exposure: the clinical implications of current research. Red. H. L. Needleman, Raven Press, N.Y., 74-87.
108. Quinlan G.J., Halliwell B., Moorhouse C.P., Gutteridge J.M. (1988) Action of lead(II) and aluminium (III) ions on iron-stimulated lipid peroxidation in liposomes, erythrocytes and rat liver microsomal fractions. *Biochim. Biophys. Acta*, 962: 196-200.
109. Rabinovitz M.B., Wetherill G.W., Kopple J.D. (1973) Lead metabolism in the normal human: stable isotope studies. *Science*, 182: 725-727.
110. Rafalowska U., Liu G.J., Floyd R.A. (1989) Peroxidation induced changes in synaptosomal transport of dopamine and gamma-aminobutyric acid. *Free Radic. Biol. Med.*, 6: 485-92.
111. Rafalowska U., Strużyńska L., Dąbrowska-Bouta B., Lenkiewicz A. (1996) Is lead toxicosis a reflection of altered energy metabolism in brain synaptosomes? *Acta Neurobiol. Exp.*, 56: 611-617.
112. Raff M.C., Miller R.H., Noble M. (1983) A glial progenitor cell that develops in vitro into an astrocyte or an oligodendrocyte depending on the culture medium. *Nature*, 303: 390-396.
113. Raine C.S. (1989) Neurocellular Anatomy w Basic neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects, 4th Ed., (Siegier G. J. i wsp.), Raven Press, Ltd., New York.
114. Ribarov S.R., Benov L.C. (1981) Relationship between the hemolytic action of heavy metals and lipid peroxidation. *Biochim. Biophys. Acta.*, 640: 721-726.
115. Rouser G., Fkeischer S., Yamamoto A. (1970) Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. *Lipids*, 5: 494-496.
116. Sapota A., Kilanowicz A. (1999) Praktyczne zastosowanie kwasu 2,3-dimerkaptobursztynowego w leczeniu ołowicy u dzieci w USA. *Pediatrics Polska*, supl. 11: 45-47.
117. Schlaepfer W.W. (1969) Experimental lead neuropathy: a disease of the supporting cells in the peripheral nervous system. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 28: 401-418.
118. Sedlak J., Lindsay R.U. (1968) Estimation of total, protein-bound and non protein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal. Biochem.*, 25: 192-205.

119. Selevan S.G., Rice D.C., Hogan K.A., Euling S.Y., Pfahles-Hutchens A., Bethel J. (2003) Blood lead concentration and delayed puberty in girls. *N. Engl. J. Med.*, 348: 1527-1536.
120. Shinitzky M., Barenholz Y. (1978) Fluidity parameters of lipid regions determined by fluorescence polarization. *Biochim. Biophys. Acta*, 515: 367-370.
121. Silbergeld E.K. (1977) Interactions of lead and calcium on the synaptosomal uptake of dopamine and choline. *Life Sci.*, 20: 309-318.
122. Silbergeld E.K. (1983) Localization of metals: issues of importance to neurotoxicity of lead. *Neurotoxicology*, 4: 193-200
123. Silbergeld E.K. (1984) Mitochondrial mechanisms of lead neurotoxicity. W: *Cellular and Molecular Neurotoxicology*. Wyd.T. Narahashi, Raven Press, N.Y., 153-164.
124. Silbergeld E.K., Adler H.S., Costa J.L. (1977) Subcellular localization of lead in synaptosomes. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, 17: 715-725.
125. Silbergeld E.K., Hruska E. (1980) Neurochemical investigations of low level lead exposure. W: *Low level lead exposure. The clinical implications of current research*. Wyd. H.L. Needleman, Raven Press – N. Y., 135-157.
126. Silbergeld E.K., Miller L.P., Kennedy S., Eng N. (1979) Lead, GABA and seizures: effects of subencephalopathic lead exposure on seizure sensitivity and GABAergic function. *Environ. Res.*, 19: 371-382.
127. Simons T.J.B. (1986) Passive transport and binding of lead by human red blood cells. *J. Physiol.*, 378: 267-286.
128. Simons T.J.B. (1986) The role of anion transport in the passive movement of lead across the human red cell membrane. *J. Physiol.*, 378: 287-312.
129. Six K.M., Goyer R.A. (1970) Experimental enhancement of lead toxicity by low dietary calcium. *J. Lab. Clin. Med.*, 76: 933-942.
130. Six K.M., Goyer R.A. (1972) The influence of iron deficiency on tissue content and toxicity of ingested lead in the rat. *J. Lab. Clin. Med.*, 79: 128-136.
131. Skoczyńska A., Smolik R., Jeleń M. (1993) Lipid abnormalities in rats given small doses of lead. *Arch. Toxicol.*, 67: 200-204.
132. Sprinkle T.J. (1989) 2'3'-Cyclic nucleotide-3-phosphodiesterase, an oligodendrocyte-Schwann cell and myelin-associated enzyme of the nervous system. *Crit. Rev. Neurobiol.*, 4: 235-301.

133. Sprinkle T.J., Wells M.R., Garver F.A., Smith D.B. (1980) Studies on the Wolfgram high molecular weight CNS proteins: relationship to 2'3'-cyclic nucleotide-3-phosphodiesterase. *J. Neurochem.*, 35: 1200-1208.
134. Staudinger K.C., Roth V.S. (1998) Occupational lead poisoning. *Am. Fam. Physician.* 57: 719-726, 731-2.
135. Stelmasiak Z. (2001) Praktyczne aspekty stwardnienia rozsianego. *Medycyna Rodzinna*, 1, zeszyt 12.
136. Sternberger N.H., Sternberger L.A. (1987) Blood-brain barrier protein recognized by monoclonal antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 84: 8169-8173.
137. Strugała-Stawik H., Pastuszek B., Zaręba A., Dembicka D. (1999) Badania stężeń ołowiu we krwi dzieci z województwa legnickiego w latach 1991-1997. *Pediatrics Polska*, supl. 11: 11-15.
138. Strużyńska L., Dąbrowska – Bouta B., Rafałowska U. (1997) Acute lead toxicity and energy metabolism in rat brain synaptosomes. *Acta Neurobiol. Exp.*, 57(4): 275-281.
139. Strużyńska L., Rafałowska U. (1994) The effect of lead on dopamines, GABA and histidine spontaneous and KCl-dependent releases from rat brain synaptosomes. *Acta Neurobiol. Exp.*, 54: 201-207.
140. Strużyńska L., Walski M., Gadamski R., Dąbrowska-Bouta B., Rafałowska U. (1997) Lead-induced abnormalities in blood-brain barrier permeability in experimental chronic toxicity. *Mol. Chem. Neuropathol.*, 31:207-24.
141. Sun L., Hu J., Zhao Z., Li L. (2003) Cheng H. Influence of exposure to environmental lead on serum immunoglobulin in preschool children. *Environ. Res.*, 92: 124-128.
142. Sundstrom R., Muntzing K., Kalimo H., Sourander P. (1985) Changes in the integrity of the blood-brain barrier in suckling rats with low dose lead encephalopathy. *Acta Neuropathol.*, 68:1-9.
143. Sypecka J., Domańska-Janik K. (1995) Expression of myelin-specific proteins during development of normal and hypomyelinated Paralytic tremor mutant rabbits. II. Studies on the purified myelin. *Mol. Chem. Neuropathol.*, 26: 67-78.
144. Sypecka J., Gajkowska B., Domańska-Janik K. (1995) Oligodendrocyte development in PLP "pt" mutant rabbits: glycolipid antigens and PLP gene expression. *Metab. Brain. Dis.*, 10: 321-33.
145. Thomas J.A., Dallenbach F.D., Thomas M. (1973) The distribution of radioactive lead (210Pb) in the cerebellum of developing rats. *J. Pathol.*, 109: 45-50.

146. Toews A.D., Blaker W.D., Thomas D.J., Gaynor J.J., Krigman M.R., Mushak P., Morell P. (1983) Myelin deficits produced by early postnatal exposure to inorganic lead or triethyltin are persistent. *J. Neurochem.*, 41: 816-822.
147. Toews A.D., Kolber A., Hayward J., Krigman M.R., Morell P. (1978) Experimental lead encephalopathy in the suckling rat: concentration of lead in cellular fraction enriched in brain capillaries. *Brain Res.*, 147: 131-138.
148. Toews A.D., Krigman M.R., Thomas D.J. Morell P. (1980) Effect of inorganic lead exposure on myelination in the rat. *Neurochem. Res.*, 5: 605-616.
149. Tomokuni K., Ichiba M., Hirai Y. (1991) Elevated urinary excretion of beta-aminoisobutyric acid and delta-aminolevulinic acid (ALA) and the inhibition of ALA-synthase and ALA-dehydrogenase activities in both liver and kidney in mice exposed to lead. *Toxicol. Lett.*, 59: 169-173.
150. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 4350-4354.
151. Ündeğer Ü., Başaran N., Canpinar H., Kansu E. (1996) Immune alterations in lead-exposed workers. *Toxicology*, 109: 167-172.
152. Urbanek-Karłowska B. (1993) Ocena pobierania ołowiu z produktów spożywczych. *Med. Pr.*, 44: 43-52.
153. Van Deenen L.L., de Gier J., Demel R.A., de Kruyff B., Blok M.C., van der Neut-Kok E.C., Haest C.W., Ververgaert P.H., Verkleij A.J. (1975) Lipid-lipid and lipid-protein interaction in model systems and membranes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 264:124-141.
154. Vance D. E., Vance J. red. (1991) *New Comprehensive Biochemistry. T. 20 Biochemistry of lipids, lipoproteins, and membranes.* Elsevier. Amsterdam, London, New York, Tokyo.
155. Victor M., Ropper A.H. (2003) *Neurologia Adamsa i Victora. Przekład wydania VII; wyd. Czelej Sp.zoo, wyd. Lublin I.*
156. Walker E.M. Jr., Stone A., Milligan L.B., Gale G.R., Atkins L.M., Smith A.B., Jones M.M., Singh P.K., Basinger M.A. (1992) Mobilization of lead in mice by administration of monoalkyl esters of meso-2,3-dimercaptosuccinic acid. *Toxicology*, 76: 79-87.
157. Waterman S.J., el-Fawal H.A., Snyder C.A.(1994) Lead alters the immunogenicity of two neural proteins: a potential mechanism for the progression of lead-induced neurotoxicity. *Environ. Health Perspect.*, 102: 1052-1056.

158. Whitfield C.L., Ch'ien L.T., Whitehead J.D. (1972) Lead encephalopathy in adults. *Am. J. Med.*, 52: 289-198.
159. Wiggins R.C., Fuller G.N. (1978) Early postnatal starvation causes lasting brain hypomyelination. *J. Neurochem.*, 30: 1231-1237.
160. Wilbur K.M., Bernheim F., Shapiro O.W. (1949) The thiobarbituric acid reagent as a test for the oxidation of unsaturated fatty acids by various agents. *Arch. Biochem. Biophys.*, 24: 305-313.
161. Windebank A.J. (1986) Specific inhibition of myelination by lead in vitro; comparison with arsenic, thallium, and mercury. *Exp. Neurol.*, 94: 203-212.
162. Winder C., Carmichael N.G. (1985) The experimental administration of lead to rats in neuropathological and behavioural studies. *J. Appl. Toxicol.*, 5: 140-147.
163. Wojewódzki Inspektorat Ochrony Środowiska w Katowicach (2002), Raport o stanie środowiska w województwie śląskim w 2001 roku. Biblioteka Monitoringu Środowiska.
164. Zakrzewski T., (1995) *Podstawy Toksykologii Środowiska*, PWN, Warszawa.
165. Zawia N.H., Harry G.J. (1995) Exposure to lead – acetate modulates the developmental expression of myelin genes in the rat frontal lobe. *Int. J. Devl. Neurosc.*, 13: 639-644.
166. Zawia N.H., Harry G.J. (1996) Developmental exposure to lead interferes with glial and neuronal differential gene expression in the rat cerebellum. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 138: 43-47.